

**JOANA SOFIA BARROS DA COSTA**

Licenciada em Bioquímica

**ÓLEO DE SEMENTES DE SOJA GENETICAMENTE  
MODIFICADA:  
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E DETECÇÃO DE ADN AO  
LONGO DA PRODUÇÃO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia  
da Universidade do Porto para a obtenção do grau  
de Mestre em Controlo de Qualidade na área da  
especialidade Água e Alimentos

Porto

2008



Trabalho realizado no Laboratório de Bromatologia da Faculdade de farmácia da  
Universidade do Porto sob a orientação de

Doutora Isabel Maria Sousa Gomes Mafra  
Professora Doutora Maria Beatriz Prior Pinto Oliveira



# COMUNICAÇÕES/PUBLICAÇÕES

---

Alguns dos resultados apresentados neste trabalho foram apresentados em várias Reuniões Científicas:

**Joana Costa**, Isabel Mafra, Joana Rocha, Joana S. Amaral, M.B.P.P. Oliveira  
**Comparison of different extraction methods of soybean DNA from refined vegetable oils**  
FIRST EUROPEAN FOOD CHEMISTRY, Liubliana - Eslovénia 2008, CD-ROM resumos. Resumo apresentado sob a forma de comunicação em painel.

**Costa, J.;** Amaral, J.S.; Casal, S.; Mafra, I.; Oliveira, M.B.P.P.  
**Effect of refining on the fatty acid, sterol and tocopherols compositions of soybean oil from GM seeds**  
COLACRO XII, Florianópolis - Brasil 2008, CD-ROM resumos. Resumo apresentado sob a forma de comunicação em painel.

**Joana Costa**, Isabel Mafra, Joana Rocha, Joana S. Amaral, M. Beatriz P. P. Oliveira  
**Detection of soybean DNA in commercially available vegetables oils**  
XXI ENCONTRO NACIONAL SPQ – Química e Inovação, Porto - Portugal 2008, livro de resumos p156. Resumo apresentado sob a forma de comunicação em painel.

**Joana Costa**, Joana S. Amaral, Susana Casal, Isabel Mafra, M. Beatriz P. P. Oliveira  
**Soybean oil from GM seeds: Chemical characterization during fat extraction and refining processes**  
AOAC EUROPEAN SECTION INTERNATIONAL WORKSHOP  
II ENCONTRO NACIONAL DE BROMATOLOGIA, HIDROLOGIA E TOXICOLOGIA, Lisboa - Portugal, livro de resumos p88. Resumo apresentado sob a forma de comunicação em painel.

**Joana Costa**, Joana S. Amaral, Susana Casal, Isabel Mafra, M. Beatriz P. P. Oliveira  
**Transgenes monitoring in an industrial soybean oil processing by conventional and real-time polymerase chain reaction**  
9º ENCONTRO QUIMICA DOS ALIMENTOS, Açores, Portugal a decorrer de 29 de Abril a 02 Maio 2009. Resumo aceite para comunicação em oral e publicação sob a forma de artigo nas Actas da Reunião.



# AGRADECIMENTOS

---

O trabalho experimental desenvolvido e do qual resultou esta tese foi realizado no Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Agradeço,

À Doutora Isabel Mafra, orientadora desta dissertação, pela disponibilidade, comunhão de conhecimentos e entusiasmo contagiante que sempre revelou e que foram determinantes para o desenvolvimento deste trabalho, bem como pela amizade, paciência e pelo seu sacrifício pessoal.

À Professora Doutora Beatriz Oliveira, orientadora desta dissertação, pela sua capacidade científica, incentivo e acolhimento que sempre me prestou, sugestões preciosas, que permitiram estruturar este trabalho e tese, o seu apoio e interesse que tornou possível a conclusão deste trabalho. Agradeço ainda a sua permanente disponibilidade e simpatia que nunca esquecerei.

À unidade industrial de Almada da empresa SOVENA, pela colaboração e gentil cedência das amostras, directamente da linha de produção.

À Doutora Joana Amaral, pelos conhecimentos práticos, pela ajuda experimental, simpatia, boa disposição, disponibilidade e amizade que sempre me demonstrou ao longo desta etapa.

À Prof. Doutora Susana Casal, pela simpatia e disponibilidade no esclarecimento de dúvidas, bem como na ajuda preciosa nas análises cromatográficas, importantes para a realização deste trabalho.

À Joana Rocha, pela disponibilidade e ajuda na execução de algumas tarefas experimentais. Agradeço ainda a boa disposição e o carinho demonstrado.

À Dr<sup>a</sup> Eulália Mendes, ao Dr. Miguel Faria, à Rita Alves, à Anabela Costa, à Sónia Soares e à Rita Coelho pelo acolhimento e simpatia.

A todas as pessoas que embora não tenham sido mencionadas tenham de alguma forma contribuído para a realização deste projecto.

Aos meus Pais e irmã, por toda a amizade, coragem, força, entusiasmo e inesgotável paciência com que me apoiaram durante todo este mestrado.

E por fim, a todos os meus amigos pela paciência, apoio e amizade.



# RESUMO

---

O óleo de soja representa uma parte muito significativa da produção mundial de óleos vegetais, totalizando cerca de 30%, apesar das sementes de oleaginosas que lhe dão origem conterem apenas 20% de matéria gorda. Tal como quase todos os óleos vegetais, o óleo de soja cru obtido por extracção com solventes tem de ser refinado para a remoção de compostos indesejáveis (fosfolípidos, ácidos gordos livres e pigmentos), que alteram a qualidade do produto. No entanto, durante o processo de refinação podem também ser eliminados componentes benéficos, tais como os fitosteróis, tocoferóis e polifenóis.

A soja (*Glycine max* L.) é a cultura geneticamente modificada mais importante da actualidade, representando cerca de 53% do total da área de culturas biotecnológicas em todo o mundo. As crescentes preocupações face ao uso de organismos geneticamente modificados (OGM) levaram à obrigatoriedade da rotulagem dos alimentos contendo mais de 0,9% OGM autorizados na União Europeia (UE). Desde a aprovação da soja com o evento GTS-40-3-2 e conhecida pelo nome Roundup Ready® (RR) na UE, a produção de óleo de soja a partir destas sementes tem vindo a aumentar. Sendo a reacção em cadeia da polimerase (PCR) a técnica de eleição para a análise de OGM em alimentos processados, alguns estudos na literatura têm demonstrado a detecção de ADN em óleos crus, no entanto, depois dos processos químicos e elevadas temperaturas que ocorrem durante as etapas de refinação da refinação, os resultados a mesma detecção têm se revelado sem sucesso.

Este trabalho inclui em dois grandes objectivos centrados no estudo de óleo de soja produzida a partir de sementes GM. O primeiro visou a caracterização química de grãos e óleo de soja ao longo da extracção e refinação do óleo. O segundo objectivo consistiu na detecção de ADN ao longo das etapas de extracção e refinação dos óleos de soja produzidos a partir de sementes GM. Para tal, pretendeu-se otimizar metodologias de extracção de ADN e técnicas de amplificação por PCR, de forma a possibilitar a detecção de ADN amplificável a partir de óleos comerciais.

Para a caracterização química, utilizaram-se essencialmente metodologias oficiais que permitiram verificar que as etapas de extracção e refinação do óleo de soja não levaram à alteração da composição em ácidos gordos, à excepção do teor em isómeros *trans*, que aumentou de 0,1 para 0,7% no último passo da refinação

(desodorização). A refinação levou a uma perda de 20% no teor de fitosteróis totais, que foi mais acentuada nas etapas de neutralização e lavagem. Ao longo da refinação do óleo de soja, registou-se uma diminuição de cerca de 30% no conteúdo em Vitamina E, sendo os isómeros  $\gamma$  e  $\delta$ -tocoferol os mais frequentes, enquanto os tocotrienóis não foram detectados. Confirmou-se o teor elevado em ácido linolénico típico do óleo de soja, bem como os teores elevados dos referidos tocoferóis com valores totais > 900 mg/kg e os fitosteróis > 300 mg/kg. Concluiu-se que o óleo obtido a partir de sementes GM cumpre os requisitos legistados para o óleo obtido de sementes convencionais. Os processos actuais de preparação dos grãos, extracção do óleo e refinação conduzem a óleos de maior valor nutricional, atendendo a que promovem a diminuição das perdas de compostos desejáveis.

Os resultados da análise de ADN durante as etapas preparativas para a extracção do óleo, incluindo respectivo subproduto, confirmaram que os lotes de grãos corresponderam a soja RR numa proporção 50% de OGM. Foi possível também comprovar a existência de contaminação tecnicamente inevitável em lotes de grãos de soja designadas como não OGM. O aspecto mais inovador da análise de ADN e também deste trabalho centrou-se nos avanços relativos à detecção de ADN em óleos refinados. Para tal, a optimização e comparação de 4 metodologias de extracção de ADN foi uma tarefa fundamental, permitindo concluir que o método mais adequado foi o Nucleospin® food kit. Através do uso deste método foi possível a obtenção de ADN amplificável por PCR qualitativa a partir de todas as etapas de refinação do óleo de soja e de todas as amostras de óleos comerciais. A análise por PCR em tempo real permitiu confirmar os resultados obtidos para cada fase da refinação do óleo de soja e permitiu obter uma estimativa da quantidade de ADN de soja presente em quase todas as amostras de óleos comerciais refinados. Estes dados vêm assim comprovar a presença de fragmentos de ADN em óleos vegetais refinados, nunca antes verificada, constituindo um avanço considerável em relação aos trabalhos descritos na literatura, que referem sobretudo a possibilidade de detectar a ADN em óleos crus e azeites não refinados. Estes resultados poderão contribuir para um avanço na detecção de OGM em óleos vegetais, permitindo rastrear possíveis adulterações quanto ao tipo de sementes utilizadas na sua produção e verificar a rotulagem em conformidade com a legislação da UE.

# ABSTRACT

---

Soybean oil comprises almost 30% of the world's vegetable oil production, although the respective oil seeds contain only 20% of fat content. As most vegetable oils, the crude soybean oil obtained after solvent extraction must be refined for the removal of undesirable compounds (phospholipids, free fatty acids and pigments), that cause a decrease in the product quality. Nevertheless, during the refining process, beneficial components, such as phytosterols, tocopherols and polyphenols can be lost.

Soybean (*Glycine max* L.) is the most important genetically modified crop, comprising about 53% of the total biotechnological planted area. The increasing concerns rose about their use lead to the compulsory labelling of foods containing more than 0.9% of authorised genetically modified organisms (GMO) in the EU. Since the approval of the soybean event GTS-40-3-2 known as Roundup Ready® (RR) soybean in EU, the production of soybean oil using RR soybean has increasing. As polymerase chain reaction (PCR) is the technique of choice for GMO analysis in processed foods, some studies reported in the literature have shown the possibility of detection DNA in crude oils, however, due to the chemical treatments and high temperatures, along refining, the same detection has not been successfully accomplished.

The aim of this work included two main issues focalised on the study of soybean oil production obtained from GM seeds. The first main objective was to characterise the soybean oil chemically along the extraction and the refining steps. The second objective consisted on the DNA detection along the extraction and the refining steps of the soybean oil production from the GM seeds. In order to detect DNA, it aimed to compare and optimise DNA extraction protocols and PCR techniques to allow obtaining amplifiable DNA from commercial vegetable oils.

For the chemical characterisation, official methods were used allowing verifying that the steps of soybean oil extraction and refining did not change the fatty acid composition, except for the *trans* isomers, which increased from 0.1% to 0.7% in the last refining step (deodorization). Refining caused a 20% loss on total phytosterols, which was more significant after the neutralization and washing steps. Along crude oil refining, a 30% reduction of Vitamin E content was observed, being the  $\gamma$ - and  $\delta$ -isomers the most frequent, while no tocotrienols were detected. The high linolenic content typically found in soybean oil was confirmed, as well as the high contents of the

referred tocoferols with total values > 900 mg/kg and the fitosterols > 300 mg/kg. It can be concluded that the soybean oil obtained from GM seeds is according to the legislated parameters defined for conventional soybean oil. The actual industrial processes of preparing the soybean grains, oil extraction and refining conduct to a higher nutritional value of oils, as they promote a decrease in the loss of beneficial compounds.

The results of the DNA analysis during the preparative steps for oil extraction, including the respective sub-product, confirmed the use of RR soybean corresponding to a proportion of 50% GMO. It was possible to verify the technically unavoidable contamination of soybean grains from lots labelled with no GMO. The main novel aspect of the DNA analysis and also of this work was obtained from the advances on DNA detection from refined oils. For that purpose, the optimisation and comparison of 4 DNA extraction protocols was a fundamental task, allowing concluding that the most adequate method was the Nucleospin<sup>®</sup> food kit. Through the use of this protocol it was possible to obtain amplifiable DNA by qualitative end point PCR from all the soybean oil refining steps and from all the refined commercial oils. The analysis by real-time PCR allowed confirming the results from each oil refining step and to obtain an estimate amount of soybean DNA present in the commercial soybean oil. These finding prove the presence of DNA fragments in refined vegetable oils, never verified before, representing a considerable advance regarding the reports described in the literature, which mention mainly the possibility of DNA detection from crude oils and unrefined olive oils. These results may contribute to an advance in the GMO detection in vegetable oils, allowing tracing possible adulterations concerning the type of seeds used for its production and verifying the labelling statements in compliance with the EU legislation.

# LISTA DE ABREVIATURAS

---

- ADN – Ácido desoxirribonucleico
- AFLP – *Amplified Fragment Length Polymorphism* (polimorfismo no comprimento do fragmento amplificado)
- AG – Ácido(s) gordo(s)
- ARN – Ácido ribonucleico
- CTAB – Brometo de cetiltrimetilamónio
- dNTP – Desoxirribonucleótidos trifosfato
- DHA – Ácido docosaheptaénoico (série  $\omega$ -3)
- EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético
- ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio de imunoadsorção com enzimas fixadas)
- EPA – Ácido eicosapentaénoico (série  $\omega$ -3)
- FAO – *Food and Agriculture Organization*
- FRET – *Fluorescence Resonance Energy Transfer*
- GM – Geneticamente modificado(a)
- HPLC – Cromatografia Líquida de Elevada Eficiência (mais vulgarmente de Alta Performance)
- IgE – Imunoglobulina E
- IRMM – *Institute of Reference Methods and Materials*
- MUFA – *Monounsaturated Fatty Acids* (ácidos gordos monoinsaturados)
- NCBI – *National Centre for Biotechnology Information*
- OGM – Organismo geneticamente modificado
- pb – pares de bases
- PCR – Reacção em cadeia da polimerase
- PUFA – *Polyunsaturated Fatty Acids* (ácidos gordos polinsaturados)
- QC-PCR – PCR quantitativa competitiva
- RAPD – *Random Amplified Polymorphism DNA* (Polimorfismo do ADN amplificado aleatoriamente)
- RR – Roundup Ready®
- SFA – *Saturated Fatty Acids* (ácidos gordos saturados)
- Taq – *Thermus aquaticus*
- T<sub>m</sub> – Temperatura de desnaturação (*melting*)

UE – União Europeia

UV – Ultravioleta

WHO – World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

# ÍNDICE GERAL

---

COMUNICAÇÕES/PUBLICAÇÕES .....	V
AGRADECIMENTOS .....	VII
RESUMO .....	IX
ABSTRACT .....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS .....	XIII
ÍNDICE GERAL .....	XV
ÍNDICE DE FIGURAS .....	XIX
ÍNDICE DE TABELAS .....	XXV
ENQUADRAMENTO GERAL .....	1
CAPÍTULO 1 .....	5
Caracterização Química do Óleo de Soja .....	5
PARTE TEÓRICA .....	7
1.1. Introdução .....	7
1.2. Fontes de óleos e gorduras .....	7
1.3. Consumo de óleos vegetais .....	8
1.4. Utilidade de óleos vegetais .....	11
1.5. Caracterização Química dos Óleos Vegetais .....	11
1.5.1. Ácidos gordos saturados (SFA) .....	12
1.5.2. Ácidos gordos monoinsaturados (MUFA) .....	12
1.5.3. Ácidos Gordos Polinsaturados (PUFA) .....	14
1.5.4. Fosfolípidos .....	14
1.5.5. Fitosteróis .....	15
1.5.6. Tocoferóis e Tocotrienóis .....	17
1.5.7. Pigmentos .....	18
1.5.8. Pesticidas .....	18
1.5.9. Elementos metálicos vestigiais .....	18
1.6. Obtenção dos Óleos Vegetais a partir da matéria-prima .....	19
1.6.1. Extracção do óleo de sementes oleaginosas .....	19
1.6.1.1. Pesagem/Limpeza/Armazenamento .....	19
1.6.1.2. Preparação – Trituração, Laminagem e Extrusão .....	20
1.6.1.3. Extracção directa por solvente .....	20
1.6.1.4. Extracção Mecânica .....	21
1.6.1.5. Extracção Mecânica e por Solvente .....	21
1.6.1.6. Remoção do solvente .....	21
1.6.1.7. Destilação .....	22
1.6.2. Refinação do óleo de sementes oleaginosas .....	22

1.6.2.1.	Desgomagem .....	24
1.6.2.2.	Neutralização .....	24
1.6.2.3.	Winterização.....	25
1.6.2.4.	Lavagem.....	25
1.6.2.5.	Branqueamento .....	26
1.6.2.6.	Desodorização .....	26
1.6.2.7.	Polimento .....	27
1.7.	Óleo de Soja.....	27
1.7.1.	Óleo de Sementes de Soja Geneticamente Modificada .....	30
PARTE EXPERIMENTAL.....		33
1.8.	Descrição das Amostras .....	33
1.8.1.	Amostragem .....	33
1.8.2.	Preparação e Armazenamento das Amostras .....	34
1.8.2.1.	Amostras provenientes de Grãos de Soja .....	34
1.8.2.2.	Amostras de Óleos Vegetais.....	34
1.9.	Métodos utilizados na Caracterização Química.....	34
1.9.1.	Determinação da Humidade .....	35
1.9.2.	Determinação da Gordura Total.....	35
1.9.3.	Determinação de Proteínas .....	36
1.9.4.	Determinação de Cinzas .....	36
1.9.5.	Determinação de Acidez .....	36
1.9.6.	Composição em Ácidos Gordos.....	37
1.9.7.	Composição em Tocoferóis e Tocotrienóis.....	38
1.9.8.	Composição em Fitosteróis.....	39
1.10.	Caracterização Química do Óleo de Soja GM .....	43
1.7.1.	Análise Nutricional.....	43
1.7.2.	Gordura Total .....	45
1.7.3.	Proteínas .....	46
1.7.4.	Composição em Ácidos Gordos.....	47
1.7.5.	Composição em Tocoferóis .....	50
1.7.6.	Composição em Fitosteróis.....	52
CAPÍTULO 2.....		57
Detecção de ADN em Óleos de Soja .....		57
PARTE TEÓRICA .....		59
2.1.	Organismos Geneticamente Modificados .....	59
2.1.1.	Soja Geneticamente Modificada .....	60
2.1.2.	OGM <i>versus</i> Alergenicidade .....	63
2.1.3.	Legislação sobre OGM.....	68
2.2.	Técnicas de detecção e quantificação de OGM .....	70
2.2.1.	Técnicas de detecção de Proteínas .....	70



2.2.2.	Técnicas de detecção de ADN.....	71
2.2.2.1.	PCR Qualitativa.....	72
2.2.2.2.	PCR Quantitativa.....	74
2.2.3.	Aplicação da PCR na detecção de ADN em óleos vegetais.....	77
PARTE EXPERIMENTAL.....		81
2.3.	Descrição das Amostras .....	81
2.3.1.	Amostras obtidas ao longo da produção de óleo.....	81
2.3.2.	Amostras Comerciais .....	81
2.3.3.	Materiais de Referência .....	82
2.4.	Cuidados gerais na aplicação das Técnicas de Biologia Molecular .....	82
2.5.	Metodologias de extracção de ADN.....	83
2.5.1.	Amostras provenientes de Grãos de Soja .....	83
2.5.1.1.	Método Wizard .....	83
2.5.1.2.	Método CTAB .....	85
2.5.2.	Amostras de Óleos Vegetais.....	86
2.5.2.1.	Método Nucleospin® Food Kit .....	87
2.5.2.2.	Método Wizard .....	89
2.5.2.3.	Método CTAB .....	89
2.5.2.4.	Método Wizard® Magnetic.....	90
2.6.	Técnicas de análise de ADN extraído.....	92
2.7.	Técnicas de amplificação por PCR.....	94
2.7.1.	PCR qualitativa.....	94
2.7.2.	PCR em tempo real.....	96
2.8.	Análise de ADN em amostras de grãos.....	99
2.8.1.	Avaliação do ADN extraído .....	99
2.8.2.	PCR Qualitativa.....	102
2.8.3.	PCR em Tempo Real .....	105
2.9.	Análise de ADN em amostras de óleos .....	110
2.9.1.	Avaliação do ADN extraído .....	110
2.9.2.	PCR Qualitativa.....	113
2.9.3.	PCR em Tempo Real .....	122
CONCLUSÃO.....		131
BIBLIOGRAFIA.....		137



# ÍNDICE DE FIGURAS

---

Figura 1 – Consumo mundial de óleos vegetais em 2007 (www.soystats.com). ....	10
Figura 2 – Estrutura vulgarmente usada para evidenciar a numeração dos carbonos nos fitosteróis. ....	16
Figura 3 – Estrutura de alguns dos fitosteróis mais comuns nos óleos vegetais. I. Colesterol; II. Campesterol; III. Estigmasterol; IV. Clerosterol; V. $\beta$ -sitosterol; VI. $\beta$ -sitostanol; VII. $\Delta^5$ -avenasterol; VIII. $\Delta^7$ -estigmasterol; IX. $\Delta^7$ -avenasterol.....	16
Figura 4 – Estruturas moleculares dos tocoferóis e dos tocotrienóis existentes na natureza ....	17
Figura 5 – Esquema dos pontos de amostragem para as amostras recolhidas durante a extracção e refinação do óleo de soja.....	33
Figura 6 – Percentagem de gordura extraída das amostras de soja correspondentes às 3 etapas de preparação para a extracção do óleo de soja (grão inteiro, partido e extrudido), ao longo do tempo. ....	46
Figura 7 – Percentagem proteína determinada nas amostras das etapas de preparação para a extracção do óleo de soja e ao subproduto do mesmo (farinha) de soja. ....	47
Figura 8 – Cromatograma obtido na análise da amostra de grão de soja extrudido.....	48
Figura 9 – Cromatograma da mistura de padrões de tocoferóis e tocotrienóis obtido por HPLC/FL: 1. $\alpha$ -tocoferol, 2. $\alpha$ -tocotrienol, 3. $\beta$ -tocoferol, 4. $\gamma$ -tocoferol: 5. $\beta$ -tocotrienol, 6. $\gamma$ -tocotrienol, 7. $\delta$ -tocoferol, 8. $\delta$ -tocotrienol, assim como do padrão interno; IS. tocol. ....	51
Figura 10 – Cromatograma de fitosteróis correspondente à amostra de óleo cru obtido por GC/FID: campesterol; campestanol; estigmasterol; clerosterol; $\beta$ -sitosterol; $\beta$ -sitostanol + $\Delta^5$ -avenasterol; $\Delta^7$ -estigmasterol; $\Delta^7$ -avenasterol e do padrão interno betulina. ....	52
Figura 11 – Principais plantações GM em 2008 (James, 2008). ....	61
Figura 12 – Esquema simplificado do gene inserido na soja RR (adaptado de Padgett et al, 1996). ....	61
Figura 13 – Evolução das principais plantações GM entre 1995-2008 (James, 2008). ....	62
Figura 14 – Esquema representativo do processo inflamatório provocado pela reacção alérgica (Prescott e Hogan, 2006). As células T CD4 <sup>+</sup> são as responsáveis pela regulação da hipersensibilidade aos alimentos. Após a activação do antígeno as células Th <sub>2</sub> produzem as IL-4, IL-5 e IL-13. IL-4 é utilizada para a maturação das células B e síntese da IgE. Estas interleucinas levam à formação de mediadores que provocam o aparecimento dos mais variadas sintomas clínicos. ....	65
Figura 15 – Representação esquemática de uma inserção típica e quatro tipos de ensaios baseados em PCR que mostram a especificidade crescente. H – ADN genómico do hospedeiro, P – elemento promotor, E – elemento melhorador, G – gene de interesse, T – elemento terminador (adaptado de Holst Jensen et al., 2003). ....	72

Figura 16 – Amplificação do gene RR da soja por PCR em tempo real. (A) representa a acumulação do fragmento alvo por medição da fluorescência (RFU) em cada ciclo de amplificação; (B) representa a regressão linear da relação entre a proporção (percentagem de OGM relativamente ao mesmo não-OGM) logarítmica de OGM e o valor Ct (cycle threshold).....	76
Figura 17 – Imagem dos óleos comerciais adquiridos no mercado.....	82
Figura 18 – Imagens representativas do método de extracção por Wizard. ....	84
Figura 19 – Imagens representativas do método de extracção CTAB. ....	85
Figura 20 – Esquema relativo à pré-concentração das amostras de óleo. ....	87
Figura 21 – Imagem ilustrativa do método de extracção de ADN – Nucleospin® food kit. ....	88
Figura 22 – Esquema resumido do método Wizard usado na extracção de ADN de amostras de óleo. ....	89
Figura 23 – Esquema representativo da aplicação do método de CTAB à extracção de ADN em amostras de óleo. ....	90
Figura 24 – Reagentes usados no método de extracção de ADN por Wizard® Magnetic DNA purification system. ....	91
Figura 25 – Electroforese em gel de agarose do ADN genómico das amostras de grãos de soja extraído pelos métodos Wizard (A) e CTAB (B): linhas 1 e 2 – grãos convencionais; linha 3 – grão GM; linha 4 – grão partido; linha 5 – grão laminado; linha 6 – grão extrudido; linha 7 – subproduto da extracção de óleo (farinha); linha M – marcador HyperLadder I (Bioline, London, Reino Unido).....	99
Figura 26 – Electroforese em gel de agarose dos produtos de PCR resultantes da amplificação do gene da lectina da soja ( <i>primers</i> GM03/GM04) de amostras provenientes das etapas de preparação para a extracção do óleo de soja GM e subproduto pós-extracção (farinha), extraídas pelos métodos CTAB (linhas 1-7) e Wizard (linhas 8-14): linhas 1-2 e 8-9 – grãos convencionais; linhas 3 e 10 – grão de soja; linhas 4 e 11 – grão partido; linhas 5 e 12 – grão laminado; linhas 6 e 13 – grão extrudido; linhas 7 e 14 – farinha de soja; linha N – controlo negativo, linha M – marcador de 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). ....	103
Figura 27 – Electroforese em gel de agarose dos produtos de PCR resultantes da amplificação específica do evento da soja RR ( <i>primers</i> GM07/GM08) de amostras provenientes das etapas de preparação para a extracção do óleo de soja GM e subproduto pós-extracção (farinha), extraídas pelos métodos CTAB (linhas 1-7) e Wizard (linhas 8-14): linhas 1-2 e 8-9 – grãos convencionais; linhas 3 e 10 – grão de soja; linhas 4 e 11 – grão partido; linhas 5 e 12 – grão laminado; linhas 6 e 13 – grão extrudido; linhas 7 e 14 – farinha de soja; linha N – controlo negativo, linha P – controlo positivo; linha M – marcador de 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). ....	104
Figura 28 – Electroforese em gel de agarose dos produtos de PCR resultantes da amplificação específica do evento da soja RR ( <i>primers</i> GM07/GM08) de amostras provenientes de grãos de soja convencional: linha 1 – grão de soja convencional (ano 2000); linhas 2-4 –	

grãos de soja convencional (ano 2006); linha B – branco de extracção; linha N – controlo negativo; linha M – marcador de 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha).....	105
Figura 29 – Gráfico da função logarítmica da fluorescência em função do número de ciclos de PCR em tempo real por amplificação do gene da lectina e utilização de sondas de hidrólise do tipo TaqMan™.....	107
Figura 30 – Curva de calibração da quantidade de ADN de soja amplificado por PCR em tempo real para o gene da lectina em função do Ct. ....	107
Figura 31 – Gráfico da função logarítmica da fluorescência em função do número de ciclos de PCR em tempo real por amplificação da soja RR e utilização de sondas de hidrólise do tipo TaqMan™. ....	108
Figura 32 – Curva de calibração da quantidade de ADN de soja amplificado por PCR em tempo real para a soja RR em função do Ct. ....	108
Figura 33 – Curva de calibração para a determinação da concentração de ADN de amostras de óleos obtida por espectrofluorimetria com a utilização do kit de fluorescência Quant-it™-Picogreen® ds DNA Kit Assay. ....	111
Figura 34 – Electroforese em gel de agarose dos produtos de PCR resultantes da amplificação do gene da lectina da soja ( <i>primers</i> LE1/LE2) de extractos provenientes de amostras comerciais de óleos obtidos pelo método Wizard: linhas 1-5 e 7-8 – óleos alimentares; linha 6 – óleo 100% soja; linha B – branco de extracção; linha N – controlo negativo, linha M – marcador de 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). ....	114
Figura 35 – Electroforese em gel de agarose dos produtos de PCR resultantes da amplificação do gene da lectina da soja ( <i>primers</i> LE1/LE2) dos extractos provenientes de amostras comerciais de óleos obtidos pelo método Wizard® Magnetic: linhas 1-5 e 7-8 – óleos alimentares; linha 6 – óleo 100% soja; linha P – controlo positivo; linha N – controlo negativo, linha M – marcador de 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha).....	115
Figura 36 – Electroforese em gel de agarose dos produtos de PCR resultantes da amplificação do gene da lectina da soja ( <i>primers</i> LE1/LE2) dos extractos provenientes de amostras comerciais de óleos obtidos pelo método CTAB: linhas 1-5 e 7-8 – óleos alimentares; linha 6 – óleo 100% soja; linha P – controlo positivo; linha N – controlo negativo, linha M – marcador de 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). ....	115
Figura 37 – Electroforese em gel de agarose dos produtos de PCR resultantes da amplificação do gene da lectina da soja ( <i>primers</i> LE1/LE2) dos extractos provenientes de amostras comerciais de óleos obtidos pelo método Nucleospin® food kit: linhas 1-5 e 7-8 – óleos alimentares; linha 6 – óleo 100% soja; linha B – branco de extracção; linha N – controlo negativo, linha M – marcador de 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha).....	116
Figura 38 – Electroforese em gel de agarose dos produtos de PCR resultantes da amplificação do gene da lectina da soja ( <i>primers</i> LE1/LE2) dos extractos provenientes das etapas de produção do óleo de soja, cru e neutralizado, extraídas a partir de diferentes quantidades de óleos pelos métodos: Wizard (linhas 1-2); Wizard® Magnetic (linhas 3-4, B) e CTAB (linhas 5-7); linhas 1, 3 e 5 – óleo cru (50 g); linhas 2 e 6 – óleo cru (32 g); linhas 4 e 7 –	

óleo neutralizado (160 g); linha B – branco de extracção; linha N – controlo negativo, linha P – controlo positivo; linha M – marcador 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha)....	117
Figura 39 – Electroforese em gel de agarose dos produtos de PCR resultantes da amplificação do gene da lectina da soja ( <i>primers</i> LE3/LE4) provenientes das primeiras etapas da refinação do óleo de soja extraídas pelo método Nucleospin® food kit: linha 1 – óleo cru; linha 2 – óleo neutralizado; linha B – branco de extracção; linha N – controlo negativo; linha M – marcador 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). ....	118
Figura 40 – Electroforese em gel de agarose dos produtos de PCR resultantes da amplificação do gene da lectina da soja ( <i>primers</i> GM03/GM04) a partir de 2 e 4 µL de extractos de ADN provenientes das primeiras etapas da refinação do óleo de soja obtidos pelo método Wizard: linha 1 – óleo cru (2 µL); linha 2 – óleo cru (4 µL); linha 3 – óleo neutralizado (2 µL); linha 4 – óleo neutralizado (4 µL); linha B – branco de extracção; linha N – controlo negativo; linha M – marcador 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha).....	119
Figura 41 – Electroforese em gel de agarose dos produtos de PCR resultantes da amplificação do gene da lectina da soja ( <i>primers</i> LE1/LE2) provenientes de extractos das etapas de refinação do óleo de soja obtidos pelo método Nucleospin® food kit: linha 1 – óleo cru; linha 2 – óleo neutralizado; linha 3 – óleo lavado; linha 4 – óleo branqueado; linha 5 – óleo desodorizado; linha B – branco de extracção; linha N – controlo negativo; linha M – marcador 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). ....	119
Figura 42 – Electroforese em gel de agarose dos produtos de PCR resultantes da amplificação específica do evento da soja RR ( <i>primers</i> RRS-3J1/RRS-3J3) provenientes de extractos de amostras comerciais de óleos extraídas pelo método Nucleospin® food kit: linhas 1-5 e 7-8 – óleos alimentares; linha 6 – óleo 100% soja; linha P – controlo positivo (material de referência certificado com 0,5% de soja RR); linha B – branco de extracção; linha N – controlo negativo, linha M – marcador de 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha)....	120
Figura 43 – Exemplo de alguns rótulos de amostras de óleos comerciais.....	121
Figura 44 – Electroforese em gel de agarose dos produtos de PCR resultantes da amplificação específica do evento da soja RR ( <i>primers</i> RRS-3J1/RRS-3J3) provenientes de extractos das etapas de refinação do óleo de soja extraídas pelo método Nucleospin® food kit: linha 1 – óleo cru; linha 2 – óleo neutralizado; linha 3 – óleo lavado; linha 4 – óleo branqueado; linha 5 – óleo desodorizado; linhas P1 a P6 – materiais de referência certificados com soja RR 0, 0,1, 0,5, 1, 2 e 5%, respectivamente; linha N – controlo negativo; linha M – marcador 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). ....	122
Figura 45 – Gráfico da função logarítmica da fluorescência em função do número de ciclos de PCR em tempo real por amplificação do gene da lectina e utilização de sondas de hidrólise do tipo TaqMan™.....	123
Figura 46 – Curva de calibração da quantidade de ADN de soja amplificado por PCR em tempo real para o gene da lectina em função do Ct. ....	124

Figura 47 – Gráfico da função logarítmica da fluorescência em função do número de ciclos de PCR em tempo real por amplificação da soja RR e utilização de sondas de hidrólise do tipo TaqMan <sup>TM</sup> . .....	124
Figura 48 – Curva de calibração da quantidade de ADN de soja amplificado por PCR em tempo real para a soja RR em função do Ct. ....	124





# ÍNDICE DE TABELAS

---

Tabela 1 – Matérias-primas mais usadas na produção de óleos vegetais e respectivo teor em óleo, produção por área de cultivo e produtores mais representativos. (O'Brien, 2000)...	10
Tabela 2 – Nomes sistemáticos, triviais e abreviaturas de diversos ácidos gordos existentes na natureza.....	13
Tabela 3 – Tipos de utilização da Soja (Lee et al., 2007).....	29
Tabela 4 – Composição química e propriedades físicas do óleo de soja (O'Brien, 2004). ....	30
Tabela 5 – Tipos de óleo de soja obtidos de sementes geneticamente modificadas (O'Brien, 2004).....	31
Tabela 6 – Análise nutricional das sementes de soja nas etapas preparativas da extracção do óleo de soja e subproduto de extracção do mesmo (farinha) (média $\pm$ desvio padrão em %). ....	43
Tabela 7 – Acidez das amostras de óleo das diferentes etapas de refinação (média $\pm$ desvio padrão em %). ....	43
Tabela 8 – Composição em ácidos gordos (percentagens relativas) das amostras de soja ao longo da cadeia de produção do óleo (média $\pm$ desvio padrão). ....	49
Tabela 9 – Composição em tocoferóis (mg/kg de óleo) das amostras de soja recolhidas ao longo da cadeia de produção do óleo de soja (média $\pm$ desvio padrão).....	51
Tabela 10 – Composição em fitosteróis (% para fitosteróis individuais e fitosteróis totais em mg/100g de óleo) das amostras de Soja ao longo da cadeia de processamento do óleo (média $\pm$ desvio padrão). ....	54
Tabela 11 – Métodos utilizados na detecção de OGM. ....	78
Tabela 12 – <i>Primers</i> usados na PCR Qualitativa.....	94
Tabela 13 – Componentes da PCR envolvidos na amplificação de amostras de grão de soja. ....	95
Tabela 14 – Componentes da PCR envolvidos na amplificação de amostras de óleos de soja. ....	95
Tabela 15 – Condições de tempo e temperatura utilizadas na PCR qualitativa.....	96
Tabela 16 – <i>Primers</i> e sondas utilizados em PCR em tempo real. ....	97
Tabela 17 – Componentes utilizados no PCR em tempo real. ....	97
Tabela 18 – Pureza, concentração dos extractos de ADN (média $\pm$ desvios padrão) das amostras provenientes das etapas de preparação para a extracção e subproduto pós-extracção (farinha) do óleo de soja GM, e comparação com a soja convencional por espectrofotometria UV.....	101
Tabela 19 – Pureza, concentração dos extractos de ADN (média $\pm$ desvios padrão) das amostras provenientes das etapas de preparação para a extracção e subproduto pós-extracção (farinha) do óleo de soja GM, e comparação com a soja convencional por análise nanofotométrica.....	102

Tabela 20 – Concentrações de ADN, nº de cópias de ADN usadas e valores de Ct obtidos por amplificação por PCR em tempo real (média ± desvios padrão) para a lectina da soja e soja RR, utilizando padrões de ADN.....	106
Tabela 21 – Resultados obtidos por PCR em tempo real (média ± desvios padrão) relativos à amplificação do gene da lectina da soja para as amostras das etapas de preparação para a extracção do óleo e subproduto após extracção (farinha). ....	109
Tabela 22 – Resultados obtidos por PCR em tempo real (média ± desvios padrão) relativos à amplificação da soja RR para as amostras das etapas de preparação para a extracção do óleo e subproduto após extracção (farinha). ....	110
Tabela 23 – Concentrações dos padrões de ADN usados e respectivos valores de fluorescência.....	111
Tabela 24 – Concentração e pureza (média ± desvio padrão) do ADN dos extractos das amostras das etapas de refinação do óleo de soja por análise nanofotométrica. ....	112
Tabela 25 – Concentração e pureza (média ± desvio padrão) do ADN dos extractos obtidos pelos métodos Wizard e CTAB a partir das amostras de óleos comerciais por análise nanofotométrica. ....	113
Tabela 26 – Concentração, pureza e respectivos desvios padrão do ADN dos extractos obtidos pelos métodos Wizard® Magnetic e Nucleospin® food kit a partir das amostras de óleos comerciais por análise nanofotométrica. ....	113
Tabela 27 – Dados sobre as concentrações de ADN, nº de cópias de ADN usadas e valores de Ct obtidos por amplificação por PCR em tempo real (média ± desvio padrão) para a lectina da soja e soja RR, utilizando padrões de ADN.....	123
Tabela 28 – Resultados obtidos por PCR em tempo real (média ± desvio padrão), relativos à amplificação do gene da lectina da soja para as amostras das etapas de extracção (óleo cru) e refinação do óleo. ....	125
Tabela 29 – Resultados da PCR em tempo real (média ± desvio padrão) relativos à amplificação da soja RR para as amostras das etapas de extracção (óleo cru) e refinação do óleo. ....	126
Tabela 30 – Concentrações de ADN, nº de cópias de ADN usadas e valores de Ct obtidos por amplificação por PCR em tempo real (média ± desvio padrão) para a lectina da soja e soja RR, utilizando padrões de ADN.....	127
Tabela 31 – Resultados da PCR em tempo real (média ± desvio padrão) relativos à amplificação do gene da lectina da soja para as amostras de óleos vegetais comerciais. ....	128
Tabela 32 – Resultados da PCR em tempo real (média ± desvio padrão) relativos à amplificação da soja RR para as amostras de óleos vegetais comerciais. ....	128
Tabela 33 – Comparação dos resultados obtidos por PCR qualitativa e PCR em tempo real.	129

---

# ENQUADRAMENTO GERAL



# ENQUADRAMENTO GERAL

---

Os consumidores actuais estão cada vez mais informados, exigentes e conscientes na escolha de produtos de elevada qualidade, benéficos para a saúde e seguros. Para responder a essas preocupações, a indústria alimentar sente a necessidade de criar continuamente novos produtos e de melhorar os já existentes, de forma a fazer face, não só à forte pressão da concorrência, mas também às exigências dos consumidores. Assim, têm surgido produtos enriquecidos ou fortificados em determinados componentes funcionais; produtos, aos quais lhes foram retirados componentes associados a um efeito deletério na saúde (produtos com baixos teores em gordura, colesterol, açúcar, etc).

Os avanços da biotecnologia, a qual permite o desenvolvimento de produtos novos e melhorados por manipulação genética, têm sido fonte de inúmeras dúvidas, por parte dos consumidores e da comunidade científica. Uma vez que os alimentos produzidos, contendo ou sendo constituídos por organismos geneticamente modificados (OGM) têm levantado inúmeras questões nos últimos anos, de forma a avaliar os possíveis riscos para a saúde pública e para o ambiente, a UE estabelece regras de avaliação da segurança alimentar no que respeita os OGM, bem como para a sua libertação e comercialização. A legislação da UE estabelece ainda regras específicas de rotulagem e rastreabilidade de OGM, obrigando a informar o consumidor quanto à presença de OGM na rotulagem dos alimentos, se o valor for acima de 0,9%.

Sendo a soja a principal cultura GM a nível mundial e com o maior número de autorizações em diversos países, incluindo na UE, o seu uso na indústria alimentar, nomeadamente na produção de óleos refinados tem vindo a crescer. Assim, pretendeu-se com este trabalho contribuir para a caracterização química do óleo de soja produzido a partir de sementes geneticamente modificadas com o evento GTS-40-3-2, que é responsável por conferir à planta a resistência ao herbicida glifosato.

O capítulo 1 deste trabalho consistiu na caracterização química do óleo de soja extraído a partir de sementes geneticamente modificadas, atendendo a alguns dos seus componentes de interesse (tocoferóis, fitosteróis, ácidos gordos essenciais e isómeros *trans*). Desta forma, pretendeu-se não só comparar a composição química do óleo extraído de sementes GM com os valores referenciados nas normas para os mesmos parâmetros do óleo de soja obtido a partir de sementes convencionais, mas

também estabelecer uma relação entre as etapas de produção usadas durante a extracção e refinação industrial deste óleo.

O outro objectivo deste trabalho apresentado no capítulo 2, e talvez o mais inovador, consistiu na detecção de ADN ao longo das etapas de preparação, extracção e refinação do óleo de soja. Para tal, pretendeu-se a optimização e comparação de metodologias de extracção de ADN a partir de óleos refinados de forma a obter fragmentos de ADN amplificáveis por PCR. A amplificação do ADN por PCR em tempo real e utilização de sondas de hidrólise específicas da espécie e da soja GM foi também objecto deste estudo de forma a confirmar os resultados por PCR qualitativa. Com a PCR em tempo real e o desenvolvimento de curvas padrão para os dois alvos mencionados, pretendeu-se ainda obter uma estimativa da proporção de OGM em sementes e óleos de soja. Por último, pretendeu-se obtenção e análise de ADN a partir de óleos refinados disponíveis comercialmente.

# **CAPÍTULO 1**

---

## **Caracterização Química do Óleo de Soja**





# PARTE TEÓRICA

---

## 1.1. Introdução

Desde os tempos pré-históricos que os humanos usam as gorduras e os óleos como alimentos, bem como para uma enorme gama de outras aplicações, dada a sua fácil obtenção. Por exemplo, os tecidos gordos libertam facilmente a sua gordura quando cozidos e os óleos são facilmente obtidos da prensagem de sementes oleaginosas. Devido às suas excepcionais qualidades, as gorduras e os óleos são matérias-primas largamente utilizadas na sociedade de hoje. Estes ingredientes conferem odor, sabor, textura e suculência aos alimentos. Os óleos e as gorduras desempenham um papel crucial na alimentação humana, sendo as fontes mais energéticas das três existentes: hidratos de carbono, proteínas e gorduras, além de muitos conterem ácidos gordos essenciais.

Existe uma grande variedade de óleos e gorduras, dado ocorrerem naturalmente numa vasta gama de sementes e frutos oleaginosos, e na maior parte dos tecidos animais. No entanto, nem todas estas gorduras e óleos têm relevância económica.

Tanto os óleos como as gorduras são substâncias hidrofóbicas, consistindo predominantemente numa fracção saponificável maioritária e numa fracção insaponificável, geralmente muito reduzida. A designação de gorduras e óleos é usada indiscriminadamente, baseando-se os termos escolhidos no estado físico dos materiais à temperatura ambiente, pelo que gorduras líquidas são habitualmente designadas por óleos.

Em última análise, é a composição química que define as características especiais de cada óleo ou gordura e que determina a integração destas matérias-primas nos mais diversos processos e aplicações (O'Brien, 2004).

## 1.2. Fontes de óleos e gorduras

Na antiguidade, os seres humanos asseguraram a sua sobrevivência na Terra como colectores e caçadores. Foi apenas há cerca de 10 000 anos que os humanos

aprenderam a domesticar plantas e animais. Durante este período as plantas de cultivo sofreram contínuas evoluções, de forma a satisfazerem a população ao longo de séculos. Actualmente, as culturas agrícolas são uma “criação humana”. Os humanos não podem sobreviver sem estas culturas, nem estas podem sobreviver sem os cuidados dos seus criadores.

Grande parte dos óleos vegetais (óleo de soja, de milho, de girassol entre muitos) provém de sementes de plantas anuais que crescem nas zonas de clima temperado. Uma segunda fonte para produção de óleos vegetais, tais como o azeite, os óleos de palma e de coco advém dos frutos oleaginosos que crescem em climas temperados quentes. A outra fonte de gordura é proveniente de animais que são criados em grande número, constituindo excelentes fontes de gorduras em zonas do planeta com temperaturas mais inconstantes (O'Brien, 2004).

São consideradas gorduras vegetais destinadas à alimentação humana as gorduras obtidas a partir das seguintes matérias-primas: gordura de coco; palmiste e palma. Os óleos vegetais para o mesmo fim são os obtidos a partir de: amendoim, algodão, arroz, babassu, bagaço de azeitona, bolota, cártamo, colza, gengibre, girassol, grainha de uva, milho, mostarda, semente de tomate, e soja, entre outros (Dec.-Lei nº 106/2005).

Os óleos vegetais edíveis estão destinados à alimentação humana e, como tal, estão considerados pela legislação. Podem ser constituídos por um único tipo de matéria-prima, sendo designados como óleos estremos. Existem ainda os óleos alimentares, resultantes da mistura de dois ou mais óleos, refinados isoladamente ou em conjunto, com a excepção do azeite. Os óleos vegetais podem ser utilizados para tempero (especialmente os estreme) ou em fritura (são preferencialmente usados girassol e soja especialmente na forma de óleos alimentares).

### **1.3. Consumo de óleos vegetais**

Os óleos e as gorduras são recursos renováveis e biodegradáveis, pelo que despertam interesse, não só a nível alimentar, como a nível das mais variadas indústrias (química, lubrificantes, biodiesel, etc). Os melhoramentos na agricultura e no cultivo das plantações tornaram possíveis a resposta à crescente procura destas matérias-primas impostas pelo crescimento da população mundial e pela utilização em cada vez mais aplicações.

Existem 18 tipos de fontes de óleos/gorduras vegetais destinadas ao consumo alimentar humano, comercializados e previstos na legislação portuguesa: soja, palma, palmiste, colza, girassol, amendoim, linhaça, coco, azeitona, sésamo, semente de tomate, grainha de uva, cártamo, bolota, bagaço de azeitona, arroz, babassu e mostarda (Dec.-Lei nº 106/2005). A colza, que também pode ser designada por canola (mais vulgarmente designada desta forma no Canadá), pode apresentar características químicas diferentes. A colza natural continha um alto teor de ácido erúico ( $C_{22:1}$ ), que é um ácido gordo tóxico para o homem. Por apuramento convencional de espécies, foi desenvolvida a colza com baixo teor de ácido erúico e baixo teor de glicosinolatos que passou a ser muito utilizada na produção de óleos edíveis e a ser designada vulgarmente por canola. Simultaneamente foi desenvolvida uma variedade rica em ácido erúico, especialmente destinada à indústria oleoquímica.

A Tabela 1 cita os tipos de sementes mais usadas na produção de óleos vegetais, referindo o seu teor em gordura, a produção destas sementes por hectare de área de cultivo, assim como os países com maiores produções (O'Brien, 2000). A palma representa uma fonte de óleo muito rentável dado que apresenta a maior produção por área de cultivo, sendo usada na produção do óleo de palma e de palmiste. As árvores de palma produzem dez vezes mais matéria-prima do que a semente de soja numa mesma área de cultivo. A maioria das sementes oleaginosas são de cultivo anual e colheita sazonal, enquanto as árvores como a produtora de palma permitem colheitas bianuais. No entanto, apesar de 3 dos 4 tipos de árvores de frutos oleaginosos produzirem frutos cujo teor em óleo são dos mais elevados, a soja, que resulta de uma colheita anual e cujo teor em óleo é relativamente baixo, domina a produção de óleos vegetais a nível mundial (O'Brien, 2004), estando actualmente em pé de igualdade com a gordura de palma.

Os óleos de maior importância são os óleos de soja, colza, palma e girassol, uma vez que representam cerca de três quartos do consumo mundial. A Figura 1 representa o consumo mundial de óleos vegetais em 2007. Estes representam cerca de 84% do total de óleos e gorduras produzidas ([www.soystats.com](http://www.soystats.com)).

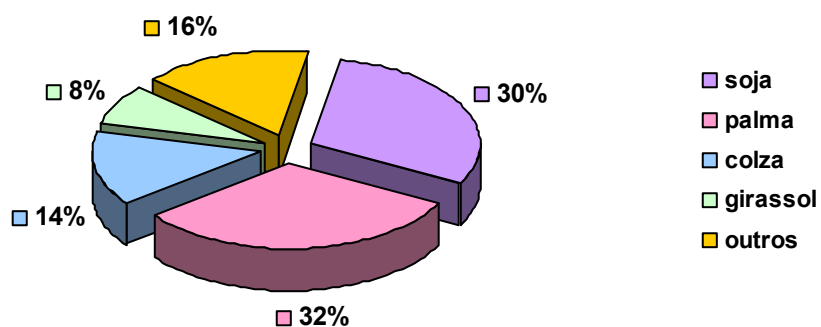
Em Portugal, destacam-se o girassol, a soja, o milho e o amendoim, como matéria-prima para a produção de óleos para consumo humano. Cerca de 50% dos óleos comercializados em Portugal são óleos alimentares que resultam, em geral, da mistura de girassol e soja. A composição em ácidos gordos e o elevado teor em gordura são as características com maior peso na rentabilidade dos óleos vegetais e na escolha das matérias-primas usadas. Outra característica muito desejada é a não libertação de odores desagradáveis quando da utilização de óleos vegetais. Nesse

sentido o óleo de soja é dos menos cotados em Portugal, sendo muitas vezes motivo de rejeição pelos consumidores. Por esse facto é usado em mistura com o girassol que não tem essa característica. No entanto, noutras áreas do globo é preferido. É o caso do Brasil em que a sua população considera o sabor do óleo de soja, o melhor, comparativamente com outros óleos.

**Tabela 1** – Matérias-primas mais usadas na produção de óleos vegetais e respectivo teor em óleo, produção por área de cultivo e produtores mais representativos. (O'Brien, 2000)

Matérias-primas	Teor em óleo (%)	Produção de óleos kg/ha	Grandes produtores de óleos
Algodão	18-20	208-235	China, Rússia, Estados Unidos
Amendoim	45-50	1255-1396	China, Índia, Nigéria
Azeitona	15-35	101-292	Espanha, Itália, Grécia
Coco	65-68	729-976	Filipinas, Indonésia, Índia
Colza (Canola)	40-45	588-662	Canadá, China, França
Girassol	35-45	516-662	Rússia, Argentina, Áustria
Milho	3,1-5,7	242-336	Estados Unidos, México, Canadá
Palma	45-50	2992-4987	Malásia, Indonésia, China
Palmiste	44-53	299-449	Malásia, Indonésia, China
Soja	18-20	447-504	Estados Unidos, Brasil, Argentina

### Consumo Mundial de Óleos Vegetais em 2007



**Figura 1** – Consumo mundial de óleos vegetais em 2007 (www.soystats.com).

## 1.4. Utilidade de óleos vegetais

A produção de óleos e gorduras é controlada pela procura e pelas quantidades disponíveis, o que influencia o valor económico. Alguns dos óleos consumidos são claramente subprodutos encaminhados para a indústria alimentar. É o caso do óleo de algodão, cuja planta visa principalmente produzir algodão. Também o óleo de milho resulta de uma aplicação secundária do milho. No caso da soja, cujo óleo é também um subproduto desta planta, é produzida essencialmente para a obtenção de proteína de elevada qualidade. Esta destinava-se essencialmente para a alimentação animal, no entanto, o elevado teor de gordura dificultava o seu consumo. Para ultrapassar tal situação, optou-se por extrair previamente a gordura e assim surgiu o óleo de soja para a alimentação humana. As gorduras animais estão dependentes da produção animal, assim como a manteiga está dependente da produção de leite.

As alterações climáticas são também determinantes na produção de óleo e gorduras, já que a ocorrência de tempestades e secas pode condicionar a produção destas matérias-primas, reduzindo as suas reservas e consequentemente aumentando o seu preço.

## 1.5. Caracterização Química dos Óleos Vegetais

As propriedades físicas e químicas dos óleos vegetais são determinadas pela sua composição em ácidos gordos e em triacilgliceróis. Quimicamente, todos os óleos são maioritariamente constituídos por ésteres de glicerol e por ácidos gordos. No entanto, as suas propriedades físicas são muito diferentes. Isto deve-se às diferentes proporções dos ácidos gordos e às diversas estruturas de triacilgliceróis existentes em cada óleo. Os ésteres de glicerol são designados por triglicéridos ou triacilgliceróis, por serem constituídos por moléculas de glicerol esterificadas com 3 moléculas de ácidos gordos. Uma vez que, cada molécula de triglicérido contém sempre uma molécula de glicerol, são os ácidos gordos que contribuem para as diferentes proporções dos triglicéridos.

Os ácidos gordos que constituem os triacilgliceróis distinguem-se por:

- ◆ comprimento da cadeia carbonada;
- ◆ número e posição das ligações duplas;
- ◆ posição dos ácidos gordos na molécula de glicerol.

As variações nestes três factores são responsáveis pelas diferenças físico-químicas verificadas nos óleos vegetais, edíveis e não edíveis. Nos óleos vegetais as cadeias dos ácidos gordos variam entre 4 e 24 átomos de carbono. Dado o elevado conjunto de possibilidades no que se refere ao número total de átomos de carbono, grau de insaturação, geometria e posição das ligações duplas na cadeia carbonada, é possível uma grande diversidade de ácidos gordos. No entanto, os mais abundantes são os de cadeia linear e com número par de átomos de carbonos. De acordo com o número de ligações duplas, os ácidos gordos podem ser classificados como saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e polinsaturados (PUFA) (Tabela 2).

Os ácidos gordos com ligações duplas, podem apresentar a configuração *cis* (também designada por Z), sendo os mais frequentes os da configuração *trans* (ou E), que surgem sobretudo em resultado do processamento dos alimentos (Amaral, 2005).

### **1.5.1. Ácidos gordos saturados (SFA)**

Os ácidos gordos saturados não têm ligações duplas na sua estrutura. São mais abundantes em gorduras sólidas de origem animal, embora também estejam presentes nas gorduras vegetais. Os ácidos gordos saturados mais vulgares são: ácido láurico (C<sub>12:0</sub>), ácido mirístico (C<sub>14:0</sub>), ácido palmítico (C<sub>16:0</sub>), ácido esteárico (C<sub>18:0</sub>), ácido araquídico (C<sub>20:0</sub>), ácido behénico (C<sub>22:0</sub>), e ácido lignocérico (C<sub>24:0</sub>). Diariamente, é aconselhável que o consumo de ácidos gordos saturados não ultrapasse os 10% do total de ácidos gordos ingeridos. Alimentos ricos neste tipo de ácidos gordos são por exemplo: o óleo de palma, o óleo de coco e as margarinas

### **1.5.2. Ácidos gordos monoinsaturados (MUFA)**

Estes ácidos gordos têm na sua estrutura uma ligação dupla. Um produto composto por este tipo de ácidos gordos é geralmente líquido à temperatura ambiente, podendo solidificar a baixas temperaturas. O ácido gordo monoinsaturado mais vulgar é o ácido oleico (C<sub>18:1</sub>), pertencente à série  $\omega$ -9. Alimentos ricos neste ácido gordo são: o azeite, (cerca de 70% da sua composição), o óleo de amendoim e o óleo de bagaço de azeitona.

**Tabela 2** – Nomes sistemáticos, triviais e abreviaturas de diversos ácidos gordos existentes na natureza.

ÁCIDOS GORDOS DE ORIGEM ANIMAL E VEGETAL MAIS COMUNS NA NATUREZA			
SÉRIE	IUPAC	NOME COMUM	ABREVIATURA
SFA	Ác. Butanóico	Ác. Butírico	C4:0
	Ác. Hexanóico	Ác. Capróico	C6:0
	Ác. Octanóico	Ác. Caprílico	C8:0
	Ác. Decanóico	Ác. Cáprico	C10:0
	Ác. Dodecanóico	Ác. Láurico	C12:0
	Ác. Tetradecanóico	Ác. Mirístico	C14:0
	Ác. Hexadecanóico	Ác. Palmítico	C16:0
	Ác. Octadecanóico	Ác. Esteárico	C18:0
	Ác. Eicosanóico	Ác. Araquídico	C20:0
	Ác. Docosanóico	Ác. Behénico	C22:0
	Ác. Tetracosanóico	Ác. Lignocérico	C24:0
MUFA	Ác. <i>Cis</i> -9-hexadecenóico	Ác. Palmitoleico	C16:1 $n$ 7
	Ác. <i>Cis</i> -9-octadecenóico	Ác. Oleico	C18:1 $n$ 9
	Ác. <i>Cis</i> -11-octadecenóico	Ác. <i>Cis</i> -vacénico	C18:1 $n$ 7
	Ác. <i>Cis</i> -13-docosenóico	Ác. Erúcico	C22:1 $n$ 9
	Ác. <i>Cis</i> -15-tetracosenóico	Ác. Nervónico	C24:1 $n$ 9
PUFA	Ác. <i>Cis</i> -9,12-octadecadienóico	Ác. Linoleico	C18:2 $n$ 6
	Ác. <i>Cis</i> -9,12,15-octadecatrienóico	Ác. $\alpha$ -linolénico	C18:3 $n$ 3
	Ác. <i>Cis</i> -5,8,11,14-eicosatetraenóico	Ác. Araquidónico	C20:4 $n$ 6
	Ác. <i>Cis</i> -5,8,11,14,17-eicosapentaenóico	Ác. eicosapentaénoico	C20:5 $n$ 3
	Ác. <i>Cis</i> -4,7,10,13,16,19-docosahexaenóico	Ác. docosahexaénoico	C22:6 $n$ 3
ÁCIDOS GORDOS MENOS FREQUENTES NA NATUREZA			
SFA	Ác. Pentadecanóico	-	C15:0
	Ác. Heptadecanóico	Ác. Margárico	C17:0
	Ác. Heneicosanóico	-	C21:0
	Ác. Tricosanóico	-	C23:0
MUFA	Ác. <i>Cis</i> -10-heptadecenóico	Ác. Margaroleico	C17:1 $n$ 7
	Ác. <i>Cis</i> -6-octadecenóico	Ác. Petroselínico	C18:1 $n$ 12
	Ác. <i>Trans</i> -9-octadecenóico	Ác. Elaídico	C18:1 $n$ 9 $t$
	Ác. <i>Cis</i> -11-eicosanóico	Ác. Gadoleico	C20:1 $n$ 9
PUFA	Ác. <i>Cis</i> -6,9,12-octadecatrienóico	Ác. $\gamma$ -linolénico	C18:3 $n$ 6
	Ác. <i>Cis</i> -11,14-eicosadienóico	-	C20:2 $n$ 6
	Ác. <i>Cis</i> -8,11,14-eicosatrienóico	Ác. Homo $\gamma$ -linolénico	C20:3 $n$ 3
	Ác. <i>Cis</i> -11,14,17-eicosatrienóico	-	C20:3 $n$ 6
	Ác. <i>Cis</i> -13,16-docosadienóico	-	C22:2 $n$ 6

SFA – saturated fatty acids (ácidos gordos saturados); MUFA – monounsaturated fatty acids (ácidos gordos monoinsaturados); PUFA – polyunsaturated fatty acids (ácidos gordos polinsaturados)

### 1.5.3. Ácidos Gordos Polinsaturados (PUFA)

Estes ácidos gordos têm na sua estrutura química duas ou mais ligações duplas, o que os torna muito reactivos. Os ácidos gordos polinsaturados mais representativos são os ácidos linoleico ( $C_{18:2}$ ) e linolénico ( $C_{18:3}$ ), referidos muito vulgarmente como ácidos gordos  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3, respectivamente. Os óleos vegetais são, regra geral, ricos em ácidos gordos polinsaturados, maioritariamente  $\omega$ -6.

Os óleos vegetais são maioritariamente compostos, não só por uma fracção glicerídica, vulgarmente denominada por fracção saponificável, mas também por uma fracção não glicerídica ou insaponificável. Parte dos componentes desta fracção minoritária pode alterar significativamente as propriedades químicas e físicas dos óleos vegetais. Os óleos crus contêm cerca de 2% de componentes insaponificáveis.

A fracção insaponificável, apesar de reduzida em comparação com a parte glicerídica da gordura, tem uma composição complexa e muito característica. Esta fracção contém, entre outros componentes, fosfolípidos, hidrocarbonetos, carotenos, tocoferóis, compostos fenólicos, álcoois, fitosteróis, álcoois triterpénicos e terpénicos, pigmentos, clorofilas, componentes de carácter ácido e básico fraco, produtos resultantes da refinação, substâncias de transformação oxidativa, drogas e seus metabolitos, vitaminas lipossolúveis, vestígios metálicos e substâncias aromáticas (O'Brien, 2004). Alguns destes compostos desempenham papéis muito importantes no funcionamento do organismo humano, sendo como tal desejáveis para a alimentação. No entanto, alguns compostos da fracção insaponificável têm uma acção pró-oxidante com acção negativa na conservação do óleo disponível ao consumidor. Por esse motivo a sua refinação é importante para remover compostos indesejáveis (toxinas, poluentes, pesticidas) minimizando as perdas dos compostos benéficos.

### 1.5.4. Fosfolípidos

Os fosfolípidos são componentes também conhecidos como fosfoglicéridos. Juntamente com as resinas e os hidratos de carbono constituem as denominadas gomas que, por causarem efeitos adversos na qualidade e rendimento da produção dos óleos vegetais, vão sendo eliminadas ao longo da refinação dos mesmos. Estes componentes podem ter os seguintes efeitos:

- ◆ capacidade emulsificante;
- ◆ retardamento da separação das fases aquosa e orgânica durante a refinação química;



- interferência na fase de branqueamento;
- degradação das superfícies dos equipamentos.

Os fosfolípidos consistem em moléculas de álcoois esterificados com ácidos gordos e ácido fosfórico, sendo catalogados segundo duas categorias: hidratáveis e não hidratáveis, de acordo com o efeito que a água tem nestes compostos.

Os fosfolípidos hidratáveis podem ser removidos do óleo por acção da água, os não hidratáveis assim como os sais de cálcio e magnésio destes, continuam na fase orgânica após a desgomagem. Para uma boa qualidade do produto final recorre-se a um pré-tratamento com ácido fosfórico ou ácido cítrico como um passo vital para uma eficaz eliminação dos fosfolípidos hidratáveis e não hidratáveis.

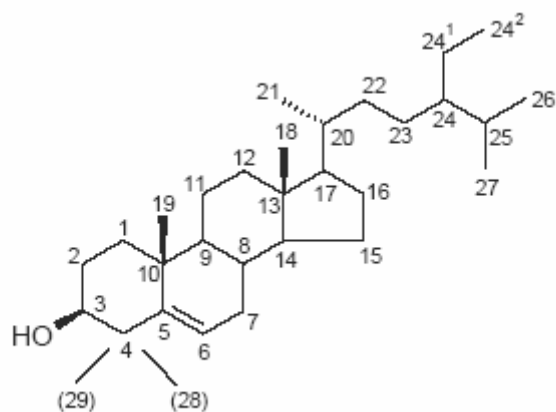
Os fosfolípidos mais comuns nos óleos vegetais são as lecitinas e as cefalinas, pelo que a maioria das sementes oleaginosas contém quantidades muito significativas deste tipo de compostos (Dijkstra, 1993; Firestone e Reina, 1996).

### 1.5.5. Fitosteróis

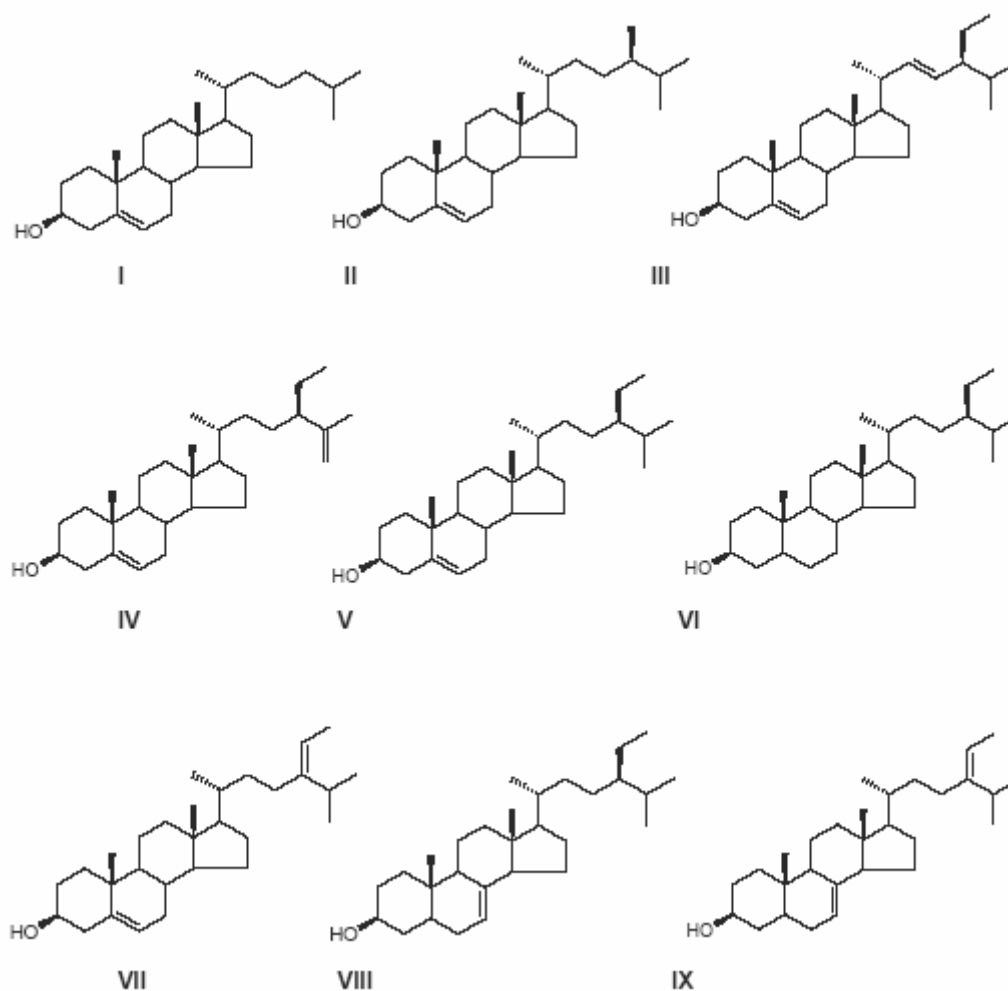
Inicialmente, não era atribuído aos fitosteróis, qualquer contributo benéfico para as propriedades dos óleos vegetais, no entanto, estudos recentes atribuem-lhes uma actividade anti-polimerizadora nos óleos aquecidos.

Os fitosteróis pertencem à família dos compostos triterpénicos, diferindo do colesterol essencialmente na cadeia lateral ligada em C<sub>17</sub> (Figura 2). Contêm um total de 28 ou 29 átomos de carbono e uma ou duas ligações duplas. A maioria dos fitosteróis apresenta uma ligação dupla entre C<sub>5</sub> e C<sub>6</sub>, designando-se  $\Delta^5$ -fitosteróis, ou entre C<sub>7</sub> e C<sub>8</sub>, designando-se neste caso por  $\Delta^7$ -fitosteróis.

Na Figura 3 estão representadas as estruturas dos fitosteróis mais vulgarmente encontrados nos óleos vegetais. Estes compostos são parcialmente removidos durante a refinação, sendo a percentagem de perda variável de acordo com o processo de refinação utilizado (Verleyen et al., 2002). Factores como a adsorção, a oxidação e a desidratação podem contribuir para a perda de fitosteróis (Ferrari et al., 1996), no entanto, a proporção entre os diferentes fitosteróis mantém-se constante ao longo da refinação (Ferrari et al., 1997). O fitosterol mais abundante é o  $\beta$ -sitosterol, seguido dos estigmasterol e campesterol.



**Figura 2** – Estrutura vulgarmente usada para evidenciar a numeração dos carbonos nos fitosteróis.

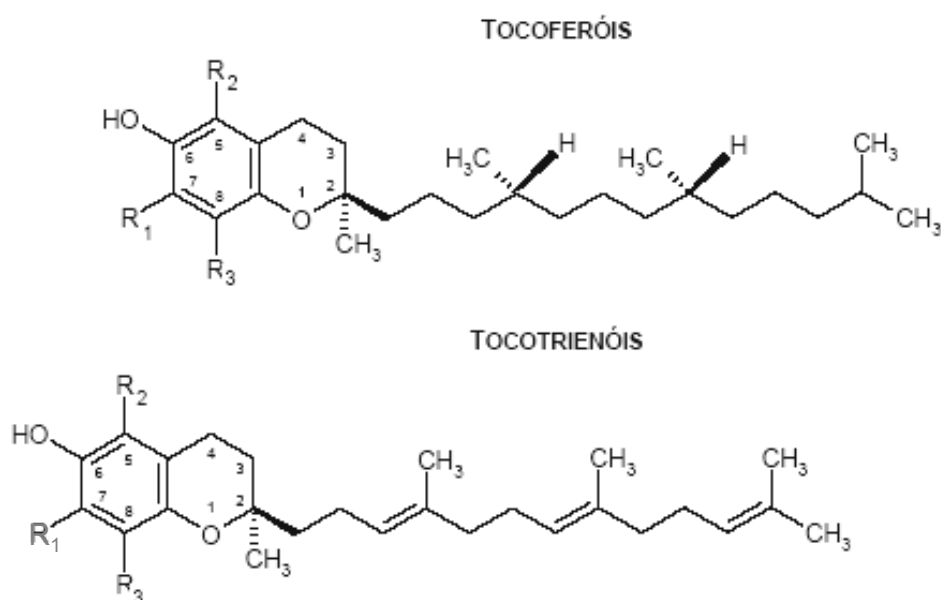


**Figura 3** – Estrutura de alguns dos fitosteróis mais comuns nos óleos vegetais. I. Colesterol; II. Campesterol; III. Estigmasterol; IV. Clerosterol; V.  $\beta$ -sitosterol; VI.  $\beta$ -sitostanol; VII.  $\Delta^5$ -avenasterol; VIII.  $\Delta^7$ -estigmastanol; IX.  $\Delta^7$ -avenasterol.

### 1.5.6. Tocoferóis e Tocotrienóis

Os tocoferóis são antioxidantes naturais presentes nos óleos vegetais. Incluem 4 tocoferóis e 4 tocotrienóis que se designam por  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ , diferindo entre si pelo número e posição dos grupos metilo no anel de 2-metil-6-cromanol (Figura 4).

A vitamina E (designação mais comum para os tocoferóis e tocotrienóis) é conhecida pela sua actividade antioxidante, dada a sua capacidade de funcionar como protector eficaz contra a oxidação lipídica. Desta forma, pensa-se que os antioxidantes presentes nos alimentos, para além de contribuírem para a sua preservação, podem, após ingestão, actuar benéficamente no organismo.



Composto	R1	R2	R3
$\alpha$	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
$\beta$	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
$\gamma$	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
$\delta$	H	H	CH <sub>3</sub>

**Figura 4** – Estruturas moleculares dos tocoferóis e dos tocotrienóis existentes na natureza

Estes antioxidantes inibem a oxidação lipídica nos alimentos, por estabilização dos radicais reactivos do oxigénio, contribuindo para a qualidade dos óleos. A estabilidade da maioria dos óleos vegetais foi atribuída à presença destes potentes

antioxidantes naturais. As sementes oleaginosas são ricas em tocoferóis e tocotrienóis, os quais se encontram predominantemente, no óleo de palma e óleo de casca de arroz. O  $\alpha$ -tocoferol é o isómero biologicamente mais activo, enquanto o  $\gamma$ -tocoferol é definido como o melhor antioxidante.

Durante o processamento industrial dos óleos vegetais o teor destes antioxidantes diminui, verificando-se as maiores reduções na refinação química e na fase da desodorização.

### **1.5.7. Pigmentos**

Os compostos corados existentes nos óleos vegetais incluem:

- ◆ carotenos, que conferem uma coloração amarela ou avermelhada aos óleos;
- ◆ clorofilas, que concedem uma tonalidade esverdeada;
- ◆ proteínas e hidratos de carbono degradados, originando tonalidades acastanhadas;
- ◆ e outros pigmentos não totalmente conhecidos e que conferem cor.

Os pigmentos são geralmente pró-oxidantes, pelo que devem ser eliminados durante a refinação. Os carotenos, presentes nos óleos vegetais são sensíveis à temperatura e facilmente adsorvidos pelas terras activadas usadas na etapa de branqueamento durante a refinação. Os pigmentos clorofílicos são eliminados mais facilmente pelas terras activadas antes de serem sujeitos a temperaturas elevadas. Os produtos de degradação das proteínas e hidratos de carbono podem ser removidos quando se expõe o óleo a temperaturas elevadas por filtração (O'Brien, 2004).

### **1.5.8. Pesticidas**

Os pesticidas são compostos largamente utilizados a nível mundial. São componentes indesejáveis e, como tal, deverão eliminados na refinação, em diversas etapas e no caso de resistirem são eliminados na desodorização (O'Brien, 2004).

### **1.5.9. Elementos metálicos vestigiais**

As plantas podem absorver metais ao longo da sua vida, ainda que em quantidades vestigiais e transmiti-los aos óleos vegetais que dão origem. A maioria

destes metais é prejudicial para a qualidade do produto e reduzem a eficiência do processo. Vestígios de cobre, ferro, manganésio e níquel reduzem substancialmente a estabilidade oxidativa dos óleos (pró-oxidantes), enquanto vestígios de cálcio, sódio e magnésio afectam negativamente a eficácia da refinação, nomeadamente os sistemas de desgomagem, branqueamento e hidrogenação. Os efeitos provocados pelos metais podem ser minimizados pelo uso de agentes quelantes (ácidos cítrico ou fosfórico) na fase inicial da refinação (O'Brien, 2004).

## **1.6. Obtenção dos Óleos Vegetais a partir da matéria-prima**

O objectivo das etapas efectuadas durante o processamento dos óleos visa o aproveitamento máximo dos triglicéridos de qualidade, bem como a obtenção de produtos de elevado valor comercial.

Os óleos podem ser extraídos por um de três processos: extracção mecânica, extracção mecânica e por solvente, e extracção directa por solvente. O processo de extracção é definido de acordo com a quantidade de óleo existente na matriz, a quantidade de óleo que permanece nas pastas depois da extracção, o capital envolvido no processamento e o valor económico do produto final.

A produção de óleos vegetais envolve 2 grandes fases: a extracção e a refinação.

### **1.6.1. Extracção do óleo de sementes oleaginosas**

#### **1.6.1.1. Pesagem/Limpeza/Armazenamento**

A maioria das sementes oleaginosas requer alguma limpeza e preparação antes da extracção da matéria gorda. As impurezas (matéria estranha) reduzem o rendimento da extracção de óleo e proteínas, afectam a qualidade do óleo e aumentam o uso e a degradação do equipamento. Folhas, pequenos paus, sementes partidas, impurezas, pequenos seixos e materiais metálicos são facilmente encontrados em sementes de soja, girassol, colza e amendoim. Assim, materiais com tamanho acima ou abaixo das dimensões definidas são eliminados por aspiração e filtração (O'Brien, 2004). Nesta fase, a maior parte das cascas são também removidas,

pois, podem reter parte do óleo extraído durante a extracção mecânica. Em seguida, as sementes podem ser armazenadas em silos, ou direccionadas de imediato para a linha de produção.

#### **1.6.1.2. Preparação – Trituração, Laminagem e Extrusão**

O processo para extracção do óleo é facilitado com a redução da semente em partículas de menores dimensões. A diminuição do tamanho das sementes permite a ruptura das células de gordura tornando-as mais acessíveis aos mecanismos de extracção. Esta tarefa é facilitada quando os fragmentos são convertidos a pequenos flocos laminados. O passo seguinte consiste na adição de vapor de água aos flocos laminados, de acordo com o tipo de sementes que estão a ser processadas. Este passo permite o rebentamento das células de gordura, tornando mais efectiva a posterior extracção do óleo.

Por fim, o último passo baseia-se na prensagem dos flocos laminados. O equipamento permite aquecer, homogeneizar e prensar sob pressão as sementes. Todas estas etapas de preparação permitem otimizar a extracção do óleo a partir de qualquer tipo de sementes oleaginosas (O'Brien, 2004).

#### **1.6.1.3. Extracção directa por solvente**

Podem usar-se 3 tipos de extracção no processamento dos óleos vegetais. A extracção directa por solvente é uma das utilizadas para sementes com baixo teor em gordura, como é o caso das sementes de soja.

Este processo permite extrair o óleo directamente das sementes previamente preparadas. A extracção por solvente consiste na aspersão em contra corrente com um solvente orgânico (normalmente hexano) sobre as sementes já prensadas e submetidas a uma temperatura de cerca de 60°C. A pasta com um teor de óleo inferior a 1% é um dos subprodutos desta fase, estando impregnada de solvente. O produto resultante da extracção é o óleo misturado com o solvente, que depois de eliminado origina o óleo cru. Este é o tipo de extracção utilizado no processamento do óleo de soja, uma vez que a semente contém cerca de 20% de gordura.

#### **1.6.1.4. Extracção Mecânica**

Este tipo de extracção é usado apenas em sementes de elevado teor em gordura ou quando na região da produção do óleo existem leis proibitivas do uso de solventes na extracção dos óleos vegetais. Assim, esta etapa destina-se à extracção do óleo a partir de sementes de girassol, milho e amendoim, que contêm cerca de 40%, 50% e 45%, respectivamente. Estas sementes são sujeitas a uma pressão mecânica que lhes extrai aproximadamente 30% da referida matéria gorda. Nesta operação obtém-se uma pasta que ainda contém cerca de 20% de gordura, podendo ser posteriormente direccionada para outra indústria, que lhe extrai a gordura restante e em seguida para a indústria de rações animal. Este é o método eleito para determinados óleos vegetais com aplicações especiais. É o caso de óleos de frutos secos, amendoim comercializados em ervanárias e dietéticas. É também o método de extracção do azeite, produto de valor acrescentado com alguma conotação positiva na prevenção de doenças cardiovasculares e cancro.

#### **1.6.1.5. Extracção Mecânica e por Solvente**

Este tipo de extracção conjuga as duas extracções já descritas. Depois de extraída a gordura mecanicamente, as pastas que ainda contêm cerca de 15 a 20% de gordura podem ser submetidas a extracção do óleo por solvente. Depois desta primeira extracção mecânica, o processo segue de forma idêntica à descrita na extracção directa por solvente.

#### **1.6.1.6. Remoção do solvente**

A pasta resultante da extracção do óleo é, posteriormente, submetida a um tratamento térmico que pode variar entre os 70°C e os 100°C, com o objectivo de remover o solvente por arrastamento com vapor directo. A farinha obtida nesta operação é geralmente granulada, sendo-lhe adicionado um outro subproduto das sementes (as denominadas gomas constituídas na sua maioria por lecitinas). Esta mistura é reencaminhada para a indústria de produção de rações animais. A mistura de solvente e vapor de água é condensada, sendo o hexano reutilizado no processo de extracção, após separação da água.

### **1.6.1.7. Destilação**

A separação do óleo e do solvente é realizada através dos métodos de destilação convencionais (O'Brien, 2004). A mistura (óleo e solvente) é submetida a um processo de destilação que permite separar os seus componentes. O solvente e a água recuperados são separados por destilação, sendo o solvente posteriormente reutilizado para nova etapa de extracção. O óleo recuperado após destilação é arrefecido e filtrado antes de ser armazenado ou refinado.

### **1.6.2. Refinação do óleo de sementes oleaginosas**

O processo de refinação de óleos e gorduras engloba uma série de operações para remoção de impurezas indesejáveis, com o objectivo de os tornar estáveis e aptos para o consumo humano. A quantidade de componentes não glicerídicos varia de acordo com a fonte do óleo, o processo de extracção a que foi submetido, a época de cultura e a região geográfica de onde a semente ou fruto oleaginoso provém. A refinação tem por objectivo a remoção dos componentes indesejáveis, com o prejuízo mínimo para os componentes desejáveis para a alimentação humana.

Componentes como carotenos, pigmentos, clorofilas, substâncias de transformação oxidativa, drogas e seus metabolitos, vestígios metálicos e substâncias aromáticas, pesticidas são alguns exemplos de compostos indesejáveis nos óleos vegetais. Estes podem interferir com a estabilidade do produto final, dado que facilitam o rápido escurecimento do óleo, podendo levar à formação de precipitados, turvação e aparecimento de sabores desagradáveis.

Os óleos e gorduras podem ser sujeitos a um dos dois tipos de refinação (física ou química) ou a uma conjugação entre estes dois métodos. O objectivo de cada tipo de refinação é essencialmente o mesmo, ou seja obter produtos comercialmente rentáveis e que obedeçam às leis impostas nos países onde serão comercializados. Habitualmente, a escolha do tipo de refinação usado, depende das características de cada óleo cru ou gordura.

Na refinação física os ácidos gordos livres são removidos por destilação (etapa equivalente à desodorização), sendo os fosfolípidos, juntamente com outras impurezas, retirados preferencialmente na destilação por vapor. Este tipo de refinação ainda não pode ser aplicado a todos os tipos de óleo edíveis.

Os óleos de palma, palmiste ou coco têm baixo teor em fosfolípidos pelo que são preferencialmente submetidos a refinação física. Os óleos de colza, girassol e



milho podem ser sujeitos a qualquer tipo de refinação, sendo a mesma determinada de acordo com a viabilidade económica do processo e os requisitos ambientais impostos na região de produção.

Para se obterem gorduras e óleos de elevada qualidade utilizando-se a refinação física, é essencial que o teor em fósforo seja inferior a 5 mg/kg antes da etapa da desodorização.

Outros óleos, como o caso de algodão, não podem ser submetidos a refinação física, dado que este necessita de um tratamento alcalino para remoção de um dos seus componentes – o gossípol. O óleo de soja, embora possa ser submetido a uma refinação física, é preferencialmente refinado por métodos químicos devido essencialmente ao seu baixo teor em gordura (apenas cerca de 20%).

O processo de refinação química mais usado e conhecido baseia-se na adição de soda caustica (NaOH). A adição de uma solução alcalina ao óleo cru provoca um conjunto de reacções químicas e físicas no processo. O hidróxido de sódio combina-se com os ácidos gordos livres para formar sabões, os fosfolípidos e as gomas absorvem a solução alcalina através de processos de hidratação ou degradação. Parte da coloração é degradada, absorvida pelas gomas e tornadas solúveis em água por acção do NaOH, assim como as partes insolúveis são envolvidas com o material coagulado.

Juntamente com o tempo e a temperatura, o excesso de soda não utilizada pode causar saponificação de parte das gorduras neutras. Tendo em conta estes factos, a escolha da concentração da solução de NaOH, o tempo de contacto com o óleo, a energia conferida à mistura óleo e solução alcalina, a temperatura e o excesso de soda são pontos muito importantes para que esta etapa seja o mais eficaz possível.

Actualmente, as práticas implementadas na refinação química são o resultado da aplicação gradual dos conhecimentos científicos ao serviço da indústria. A separação eficiente dos sabões e do óleo neutralizado é um passo determinante neste tipo de refinação, utilizando-se a centrifugação como método de separação. Deste modo, é possível tornar toda produção do óleo como um processo contínuo. Dado que este tipo de refinação é o mais vulgarmente utilizado na produção de óleo de soja, esta terá uma maior relevância neste trabalho.

As principais etapas envolvidas na refinação química incluem: a desgomagem, a neutralização, a lavagem, o branqueamento e a desodorização (Akoh e Min, 2002). Outras etapas, como a desmargarinação, winterização e polimento poderão também ser incluídas.

### 1.6.2.1. Desgomagem

A desgomagem consiste num processo de lavagem com água com o objectivo de remover os fosfolípidos, por estes compostos se hidratarem espontaneamente e formarem precipitados. Esta etapa pode ser efectuada simultaneamente com a etapa subsequente – a neutralização. No caso de óleos ricos em fosfolípidos, tais como os óleos de soja e colza, a desgomagem é uma operação efectuada separadamente.

Para melhoramento da desgomagem, pode efectuar-se um pré-tratamento a quente com adição de ácido fosfórico em concentrações de 300 a 1000 mg/kg para a soja e 1000 a 3000 mg/kg no caso da colza, durante um período mínimo de 4 horas. O objectivo deste pré-tratamento ácido consiste:

- ◆ na precipitação dos compostos fosfatados;
- ◆ na precipitação dos iões cálcio e magnésio como sais de fosfato;
- ◆ na inactivação de vestígios metálicos de cobre e ferro que eventualmente possam estar presentes no óleo;
- ◆ na redução das perdas de óleo;
- ◆ na desestabilização e aumento da remoção de pigmentos numa fase posterior, o branqueamento;
- ◆ no melhoramento da cor e sabor do óleo no produto final.

### 1.6.2.2. Neutralização

Os óleos crus desgomados ou contendo ácido fosfórico são misturados continuamente com uma solução de NaOH aquecida para quebrar a emulsão. A selecção do tratamento com NaOH depende do tipo de óleo a refinar, do teor em ácidos gordos livres e do equipamento disponível para a refinação do óleo (O'Brien, 2004). A força iónica da solução alcalina é medida em termos de densidade e expressa em graus Baumé (Bé).

A adição do hidróxido de sódio cuja densidade varia entre os 18-22° Baumé (ou seja, a concentração de NaOH varia entre os 28,5 M e os 29,5 M) vai depender essencialmente da acidez da matéria-prima, que geralmente varia entre 0,9 e 1,5 g de ácidos gordos livres por 100 g de óleo. Esta adição corresponde a 200 L de NaOH a 10 toneladas de óleo de soja por hora, ou seja, 15,3 L de NaOH por tonelada de óleo). A conversão de graus Baumé para concentração molar ocorre de acordo com a equação:

$$^{\circ}\text{Baumé} = 145 - \frac{145}{d}; \text{ em que } d \text{ é a densidade expressa em g cm}^{-3}$$

Esta adição corresponde a 2,3% do óleo a neutralizar. A adição de ácido fosfórico e de solução de NaOH depende da quantidade de fosfolípidos do óleo cru. A neutralização tem como objectivo eliminar os ácidos gordos livres sob a forma de sabões. Nesta fase, ocorre uma centrifugação que permite a eliminação de parte dos sabões formados durante a neutralização. A quantidade de sabões que ficam após a centrifugação é aproximadamente 400 mg/kg.

### **1.6.2.3. Winterização**

Devido à crescente demanda de óleos vegetais contendo elevado teor em ácidos gordos insaturados, surgiu a necessidade de proceder a uma desmargarinação dos óleos para que estes mantenham as suas características de limpidez durante o armazenamento e o tempo de exposição nas prateleiras das superfícies comerciais. As ceras são ésteres e álcoois gordos de elevado ponto de fusão e baixa solubilidade nos óleos, os quais solidificam após um determinado período de tempo, conferindo um aspecto turvo aos óleos (O'Brien, 2004).

Assim, determinados óleos, nomeadamente os de girassol, que contêm estas ceras que à temperatura ambiente solidificam e precipitam, exigem a sua remoção. Esta remoção efectua-se por abaixamento da temperatura do óleo até um máximo de 6°C por um período de 8 horas, o que induz a cristalização dos álcoois, designados por margarinas, e consequentemente a sua posterior separação. Esta winterização é também vulgarmente designada como uma primeira desmargarinação. No entanto, há óleos que não contêm estes compostos, como é o caso do óleo de soja, não sendo por isso sujeitos a esta operação.

### **1.6.2.4. Lavagem**

A lavagem pode ser composta por uma ou duas etapas. O óleo neutralizado sofre lavagem com a adição de água a 80°C, a qual permite a remoção da maior parte dos sabões, substâncias alcalinas e o excesso da soda, sendo as duas fases separadas por uma centrifugação.

No entanto, esta fase não remove fosfolípidos que permaneceram no óleo após neutralização, nem remove os sabões complexados com cálcio e magnésio presentes no óleo cru. Estes complexos metálicos devem ser previamente removidos nas fases anteriores de desgomagem e neutralização. Os sabões complexados com ferro funcionam como pró-oxidantes, enquanto os sabões de cálcio e magnésio são insolúveis em água (Weidermann, 1981). Muitos produtores adicionam cerca de 400 mg/kg de ácido cítrico às águas de lavagem para possibilitar a remoção destes resíduos (O'Brien, 2004). Após a lavagem, o óleo resultante contém aproximadamente 6 mg/kg de sabões.

#### **1.6.2.5. Branqueamento**

Esta etapa recorre à acção de carvão activado ou terras activadas para remover pigmentos e compostos que dão cor aos óleos e que, simultaneamente, têm acção pró-oxidante, interferindo no prazo de validade do produto final. A sua escolha depende do tipo e qualidade da matéria-prima, do tipo de contaminação bem como do seu valor comercial. Pode também ser influenciada pela qualidade que se pretende obter no produto final. Este processo ocorre a temperaturas elevadas (cerca de 100°C), em vácuo e a uma pressão de 600 mmHg. Cada 4 kg de terras activadas permite o branqueamento de uma tonelada de óleo. Neste processo, podem-se eliminar produtos de oxidação, tais como: peróxidos, aldeídos e cetonas; pigmentos (tais como carotenos e clorofila); e resíduos de sabão. O tipo de terras activadas a usar depende do tipo de óleo e da cor final pretendida. O resíduo sólido formado (terra de branqueamento com os vários produtos adsorvidos e algum óleo que é arrastado) é separado do óleo por filtração.

#### **1.6.2.6. Desodorização**

A desodorização permite a remoção de substâncias voláteis indesejáveis que conferem odor e sabor ao óleo, tais como ácidos gordos de baixa massa molecular, aldeídos, cetonas, álcoois, peróxidos, e outros compostos orgânicos (Akoh e Min, 2002). A maioria dos óleos vegetais crus contém sabores e odores característicos muito desagradáveis, além de adquirirem outros durante as etapas da refinação (O'Brien, 2004).

A desodorização é o último passo do processamento dos óleos, durante o qual o odor e sabor, bem como a estabilidade dos óleos podem ser afectados. As condições desta operação dependem do tipo de óleo, da sua qualidade e do sistema de refinação usado. Este passo realiza-se entre os 180° e os 270°C sob vácuo, sendo o aquecimento do óleo efectuado com vapor indirecto (Wrenn, 1995). A introdução de azoto ou vapor de água é efectuada em vários pontos para que a circulação seja em contra corrente com o óleo, permitindo o arrastamento de todos os compostos voláteis indesejáveis. No processamento do óleo de soja, esta etapa ocorre a 240°C sob vácuo e a uma pressão de 2 mbar durante um período de 2 horas.

#### **1.6.2.7. Polimento**

Esta fase não é obrigatória na refinação de óleos vegetais, no entanto, é muito vulgarmente usada. O polimento consiste no arrefecimento do óleo entre 10° e 14°C durante um período de 24 horas, seguido de filtração para remoção de quaisquer impurezas que ainda existam. Este óleo é depois armazenado em tanques apropriados à sua conservação. É posteriormente encaminhado para uma eventual mistura com outros óleos edíveis e por fim para o respectivo embalamento. No caso de óleos como o de girassol, esta etapa constitui uma segunda desmargarinação, sendo os objectivos desta operação em tudo semelhantes à anteriormente descrita como winterização.

### **1.7. Óleo de Soja**

O óleo de soja é produzido a partir de sementes de soja, *Glycine max* L., que crescem um pouco por todo o mundo. A soja é nativa da zona Este da Ásia fazendo parte da alimentação dos chineses há já centenas de anos. Esta semente foi introduzida pela primeira vez na Europa no século XVII e depois levada para os Estados Unidos no século seguinte, sendo muito apreciada um pouco por todo o mundo (Lee et al., 2007).

A soja é constituída, em média, por 40% de proteína, 20% de gordura, 35% de hidratos de carbono e 5% de cinzas com base no peso seco da semente (Liu, 1997). Cada componente é afectado pelas condições ambientais na fase de crescimento e varia de acordo com os diferentes genótipos. Cerca de 50 kg de sementes de soja produzem 40 kg de proteína e 9 kg de óleo de soja (Lee et al., 2007).

A soja é, actualmente, uma fonte essencial e dominante de proteína e óleo com numerosas utilizações, quer na alimentação animal e humana, quer em aplicações industriais (Tabela 3). Constitui uma das maiores fontes de óleos vegetais em todo o mundo, assim como fonte de proteínas que são preferencialmente utilizadas na produção de rações animais.

Estudos recentes atribuem ao consumo da soja grandes benefícios nutricionais e medicinais, dado que previne o aparecimento de cancro, diminui o colesterol sérico e reduz os riscos de osteoporose e de doenças cardíacas (Birt et al., 2004).

Actualmente verifica-se um aumento da procura de óleos edíveis, assim como o aumento da procura de carne, conduzindo a uma maior demanda de proteínas da soja para o fabrico de rações animais e do seu óleo. Além da utilização da soja na indústria alimentar, esta semente tem outras inúmeras aplicações, tais como em materiais de construção, plásticos, medicamentos, cosmética e biodiesel. Este último constitui presentemente, uma óptima fonte de energia limpa e menos poluente do que os derivados do petróleo (Tabela 3).

A proteína de soja é bastante equilibrada comparativamente com as restantes fontes proteicas. O óleo das sementes é composto por 5 ácidos gordos maioritários. Os ácidos, palmítico e esteárico, são os ácidos gordos saturados mais abundantes, representando 15% do óleo. Os ácidos insaturados (oleico, linoleico e linolénico) constituem os restantes 85% do óleo (Lee et al., 2007).

A soja constitui também uma excelente fonte de vitaminas do complexo B, minerais, ácido fólico e isoflavonas, às quais se atribuem a preventiva do cancro, de osteoporose e de doenças do coração (Wilson, 2004).

O óleo de soja tornou-se nos últimos anos num óleo largamente consumido devido à sua abundância, valor económico e elevada funcionalidade (Tabela 4).

Este óleo pode sofrer diferentes tipos de processamento e fazer parte da formulação de variadíssimos produtos. Trata-se de um óleo que refina a baixo custo, sendo considerado de qualidade para tempero.

Um dos principais pontos negativos do óleo de soja está relacionado com o fenómeno de reversão que leva à formação de odores desagradáveis (peixe) quando aquecido a temperaturas elevadas (fritura). No entanto, há países em que a sua população aprecia o seu sabor (caso do Brasil).

Tabela 3 – Tipos de utilização da Soja (Lee et al., 2007).

PRODUTOS COM SOJA		PRODUTOS DERIVADOS DO ÓLEO			PRODUTOS COM PROTEÍNAS DE SOJA
	Glicerol, ácidos gordos e esteróis	Óleo refinado	Lecitinas da Soja	Pastas de soja	Produtos alimentares
USOS EDÍVEIS	USOS TÉCNICOS	USOS EDÍVEIS	USOS EDÍVEIS	USOS EDÍVEIS	USOS NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL
Semente	Oleoquímica	Creme do café	<b>Agentes emulsificantes</b>	Massas alimentares	Aquacultura
Ração animal	Biodiesel	Óleos alimentares	Produtos de padaria	Comida para bebé	Alimentação para abelhas
Soja germinada	Solventes	Leites embalados	Doces/chocolate	Ingredientes para a padaria	
Sementes cozinhadas		Margarina	Revestimentos	Produtos para doçaria	Comida de peixe
Farinha de soja		Maionese	Produtos farmacêuticos	Cereais	Rações para gado
Doces		Medicamentos		Produtos dietéticos	Concentrados de proteínas
Pão		Cosmética	<b>Usos Nutricionais</b>	Bebidas	
Donuts		Molhos para saladas	Alimentação	Massas chinesas	Rações para animais domésticos
Sobremesas geladas		Veículo de aditivos	Medicina	Leite hipoalergénico	
Leite de soja				Revestimento das salsichas	Rações para animais jovens
Farinha para panquecas		<b>USOS TÉCNICOS</b>	<b>USOS TÉCNICOS</b>	Fermento	
Tartes		Agentes anticorrosivos	Álcool	Cerveja	
Doces		Agentes antiestáticos	Fermento		
		Material de construção	Margarina	<b>USOS TÉCNICOS</b>	<b>Cascas</b>
<b>Grãos de soja tostados</b>		Cimento		Colas	Rações diárias
Doces		Lápis de cor	<b>Agentes dispersantes</b>	Antibióticos	
Ingredientes para bolachas		Epóxidos	Tintas	Emulsões	
Molho		Isolamento eléctrico	Tintas para impressão	Material de construção	
Bolachas de água e sal		Fungicidas	Insecticidas	Nutrientes e aditivos de fermentação	
Café		Fluidos hidráulicos	Fitas magnéticas	Fibras	
Manteiga		Tintas de impressão	Papel	Tintas para impressão	
Artigos dietéticos		Lubrificantes	Borracha	Substituintes da pele	
		Tintas		Plásticos	
<b>Derivados da soja</b>		Pesticidas	<b>Agentes Estabilizantes</b>	Revestimentos de papel	
Tofu		Plastificantes	Aditivos agentes humidificantes	Poliésteres	
Leite de soja		Revestimento de protecção	Cosméticos	Pesticidas/fungicidas	
Miso		Sabões e champô	Pigmentos de pintura	Produtos farmacêuticos	
Tempera		Detergentes		Têxteis	
		Plásticos de vinil			

**Tabela 4** – Composição química e propriedades físicas do óleo de soja (O'Brien, 2004).

<b>Características</b>	<b>Média</b>	<b>Intervalo</b>
Gravidade Específica (25/25°C)	0,9175	0,917 a 0,921
Índice de Refracção (25°C)	1,4728	1,470 a 1,476
Índice de Iodo	131	123,0 a 139,0
Índice de Saponificação	192	189 a 195
Matéria Insaponificável	0,6	0,6 a 1,6
Ponto de Fusão (°C)	-22	-20,0 a -23,0
Ponto de Solidificação (°C)	–	-16,0 a -10,0
Ponto de Turvação (°C)	-9	–
Teste do frio (horas)	25	–
Resistência à Oxidação (horas)	–	12,0 a 15,0
Teor em Tocoferóis (mg/kg)		
α - Tocoferol	100	56 a 165
β - Tocoferol	23	16 a 33
γ - Tocoferol	842	593 a 983
δ - Tocoferol	363	328 a 411
Teor em Ácidos Gordos (%)		
Mirístico (C <sub>14:0</sub> )	0,1	< 0,2
Palmítico (C <sub>16:0</sub> )	10,6	8,0 a 13,3
Palmitoleico (C <sub>16:1</sub> )	0,1	< 0,2
Margárico (C <sub>17:0</sub> )	0,1	–
Esteárico (C <sub>18:0</sub> )	4,0	2,4 a 5,4
Oleico (C <sub>18:1</sub> )	23,3	17,7 a 26,1
Linoleico (C <sub>18:2</sub> )	53,7	49,8 a 57,1
Linolénico (C <sub>18:3</sub> )	7,6	5,5 a 9,5
Araquídico (C <sub>20:0</sub> )	0,3	0,1 a 0,6
Gadoleico (C <sub>20:1</sub> )	–	< 0,3
Behénico (C <sub>22:0</sub> )	0,3	0,3 a 0,7
Erúcico (C <sub>20:1</sub> )	–	< 0,3
Lignocérico (C <sub>24:0</sub> )	–	< 0,4
Composição em Triglicéridos		
Trisaturados (GS3)	0,1	–
Dissaturados (GS2U)	5,6	–
Monosaturados (GSU2)	35,7	–
Trinsaturados (GU3)	58,4	–

G – glicéridos; S – saturados; U – Insaturados.

### 1.7.1. Óleo de Sementes de Soja Geneticamente Modificada

O maior inconveniente do óleo de soja é a sua riqueza em ácido linolénico que, sendo um ácido gordo essencial, sofre facilmente oxidação originando odores desagradáveis típicos. Para obviar esse inconveniente, nos últimos 30 anos registou-se um progresso muito significativo na composição em ácidos gordos do óleo de soja obtido a partir de plantas geneticamente modificadas. Embora parte da investigação



levada a cabo para o desenvolvimento de novas plantações, se baseie nas mutações genéticas naturais que ocorrem nas plantas, ou seja em técnicas de melhoramento convencional, os maiores avanços registados nos últimos anos devem-se essencialmente ao progresso da biotecnologia ao serviço do melhoramento genético. Actualmente, existem técnicas que permitem aumentar ou diminuir os teores de determinado ácido gordo num óleo para um atributo específico ou aplicação.

Após ter sido criada e amplamente cultivada a que é considerada ainda uma das melhores culturas GM da actualidade, a cultura de soja GTS-40-3-2 (Roundup Ready®), mais vulgarmente designada por soja RR, tem sido alvo de estudos direccionados para o desenvolvimento de novas modificações genéticas de forma a tornar a composição em ácidos gordos mais adequada ao fim a que se destinam. No entanto, apenas 4 grandes modificações gerais têm sido seguidas, nomeadamente, a diminuição do ácido linolénico, o aumento do ácido oleico, a diminuição do ácido palmítico e o aumento dos ácidos gordos saturados (Tabela 5). Cada uma destas alterações introduzidas nas sementes de soja permite a obtenção de óleos vegetais dotados de diferentes características e destinados a aplicações específicas.

**Tabela 5** – Tipos de óleo de soja obtidos de sementes geneticamente modificadas (O'Brien, 2004).

Composição em Ácidos Gordos (%)	AG SATURADOS		AG INSATURADOS			Valor de lodo
	Palmítico	Estearico	Oleico	Linoleico	Linolénico	
	(C <sub>16:0</sub> )	(C <sub>18:0</sub> )	(C <sub>18:1</sub> )	(C <sub>18:2</sub> )	(C <sub>18:3</sub> )	
Soja Convencional	10,4	3,2	23,5	54,6	8,3	136,5
Baixo teor em linolénico	12,2	3,6	24,2	57,2	3,8	130,1
Elevado teor em oleico	6,4	3,3	85,6	1,6	2,2	82,1
Baixo teor em AG saturados	3,0	1,0	31,0	57,0	9,0	148,9
Baixo teor em palmítico	5,9	3,7	40,4	43,4	6,6	127,2
Elevado teor em palmítico	26,3	4,5	15,0	44,4	9,8	115,4
Elevado teor em estearico	8,6	28,7	16,2	41,6	4,9	98,8

Os óleos de soja com elevado teor em ácido oleico (80-90%) são, geralmente, considerados mais saudáveis do que os óleos obtidos a partir da soja convencional, devido ao reduzido teor de ácidos gordos saturados e ao reduzido teor de ácido linolénico. A soja com elevado teor de ácido oleico é destinada principalmente à indústria alimentar (produção de óleos vegetais), devido essencialmente ao seu elevado interesse nutricional, à semelhança do azeite.

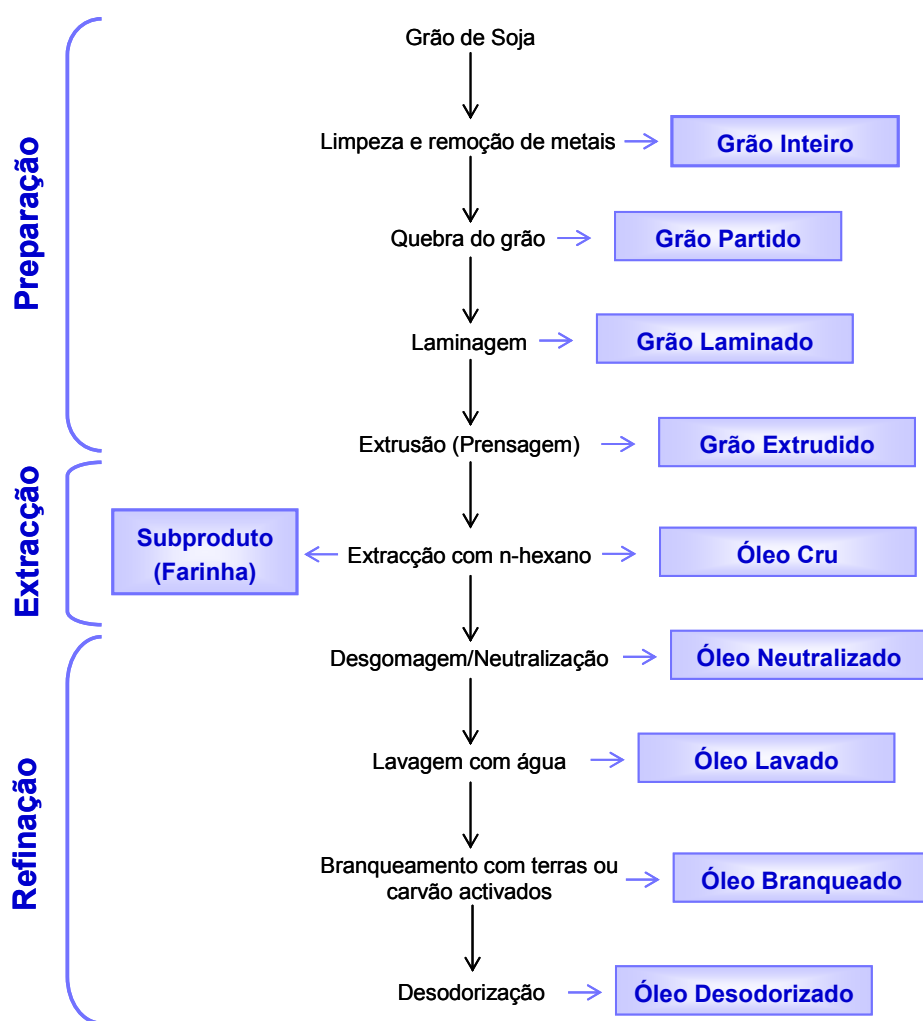


# PARTE EXPERIMENTAL

## 1.8. Descrição das Amostras

### 1.8.1. Amostragem

As amostras analisadas foram recolhidas ao longo da cadeia de processamento do óleo de soja, desde a semente inteira até ao óleo pronto a ser misturado (Figura 5), quer como óleo alimentar, quer para ser directamente embalado como óleo de soja.



**Figura 5** – Esquema dos pontos de amostragem para as amostras recolhidas durante a extracção e refinação do óleo de soja.

As várias etapas de amostragem foram recolhidas directamente da linha de produção industrial de óleo de soja, durante as etapas preparativas para a extracção, na etapa de extracção e na refinação. As amostras foram gentilmente cedidas por uma unidade industrial de extracção e refinação de óleos vegetais.

## **1.8.2. Preparação e Armazenamento das Amostras**

### **1.8.2.1. Amostras provenientes de Grãos de Soja**

As amostras de soja foram trituradas com uma picadora Moulinex modelo 320, até obtenção de um pó muito fino de cada amostra. Todas as amostras foram tratadas independentemente e manipuladas de forma a evitar qualquer tipo de contaminação.

No final, obtiveram-se amostras independentes correspondentes a cada uma das etapas de preparação para a extracção do óleo de soja (grão inteiro, grão partido, grão laminado e grão extrudido) e ao subproduto da extracção do mesmo (farinha) (Figura 5). Cada amostra foi acondicionada num recipiente esterilizado e mantida a - 20°C até posterior caracterização química e análise de ADN.

Neste estudo, foram também utilizadas 4 amostras de grãos de soja previamente fornecidos pela mesma indústria e rotulados como não OGM, as quais se designaram neste trabalho como soja convencional. Dessas amostras, uma encontrava-se datada do ano 2000 e restantes do ano de 2006.

### **1.8.2.2. Amostras de Óleos Vegetais**

As amostras de óleo corresponderam ao óleo cru e aos quatro passos da refinação (desgomagem/neutralização, lavagem, branqueamento e desodorização) (Figura 5). Estas amostras foram recolhidas directamente da cadeia de processamento. Posteriormente, foram transferidas para frascos de vidro escuro de forma a evitar o contacto com a luz e com o oxigénio, sendo armazenadas em local escuro e fresco até posterior análise (caracterização química e análise de ADN).

## **1.9. Métodos utilizados na Caracterização Química**

Este estudo envolveu uma primeira parte que consistiu na avaliação dos parâmetros químicos e nutricionais das amostras de grãos de soja consideradas.

Cada amostra (grão inteiro, partido, laminado, extrudido e farinha) foi submetida à determinação da humidade, proteína, gordura total e cinzas. Nos óleos (óleo cru, neutralizado, lavado, branqueado e desodorizado), determinou-se o grau de acidez. Ainda no âmbito da caracterização química, em todas as amostras (Figura 5) determinou-se a composição em ácidos gordos, tocoferóis e fitosteróis. Todas as amostras foram analisadas em triplicado. O teor de hidratos de carbono nas amostras sólidas foi calculado por diferença.

### **1.9.1. Determinação da Humidade**

A humidade foi determinada de acordo com o método oficial da AOAC 925.10. Cerca de 4 g de cada amostra (grão inteiro, partido, laminado e extrudido e farinha) foram rigorosamente pesados e dispostos num prato apropriado para uma balança de humidade SMO 01 (Scaltec, Goettingen, Alemanha). Cada amostra foi aquecida à temperatura de  $100 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , sendo o teor em água calculado automaticamente.

### **1.9.2. Determinação da Gordura Total**

A determinação da gordura total foi realizada apenas para as amostras de grãos correspondentes às etapas de preparação para extracção do óleo de soja (grão inteiro, partido, laminado e extrudido) e ao subproduto de extracção do mesmo (farinha), uma vez que as amostras de óleo são aproximadamente 100% de gordura total. Esta análise foi efectuada de acordo com o método recomendado pela NP EN ISO 659 (1998).

Cerca de 1 g de cada amostra triturada foi rigorosamente pesado e misturado com sulfato de sódio anidro até a amostra apresentar um aspecto totalmente seco. A amostra foi colocada num cartucho procedendo-se à extracção da gordura por Soxhlet (Extraction system Büchi B-811, Flawil, Suíça) com éter de petróleo 40-60 durante intervalos de tempo definidos 3h. Algumas das amostras de grãos de soja foram sujeitas a extracção por Soxhlet por períodos de tempo diferentes, de forma a permitir uma avaliação acerca do teor em gordura total destas mesmas amostras e acerca da importância das etapas de preparação para a extracção do óleo de soja. Desta forma, as amostras correspondentes aos grãos de soja inteiros e partidos foram sujeitas a 3, 5, 9 e 12 horas de extracção com solvente, enquanto a amostra de grão extrudido sofreu extracção durante um período de 3 e 12 horas. A gordura extraída de cada

amostra foi recolhida num copo previamente tarado, e colocada na estufa a cerca de 100°C de forma a garantir a completa remoção do solvente até obtenção de peso constante.

### **1.9.3. Determinação de Proteínas**

A determinação de proteínas foi efectuada pelo método Kjeldahl, segundo o método oficial da AOAC 945.39.

Foi pesado rigorosamente cerca de 1g de cada amostra (grão inteiro, partido, laminado, extrudido e farinha) em papel vegetal, embrulhando-se a amostra no papel em forma de cartucho.

A digestão das amostras foi efectuada por acção de 20 mL de ácido sulfúrico puro na presença de 2 pastilhas de catalisador, Kjeldahl tablets (Merck, Darmstadt, Alemanha), de forma a converter o azoto orgânico em iões amónio. Depois de alcalinizar a solução, procedeu-se à destilação da amónia (Distillation Unit Büchi 321, Flawil, Suíça), a qual foi recolhida numa solução de 25 mL de ácido sulfúrico a 0,25 M. Para a titulação foi utilizado o indicador de pH, vermelho de metilo. A solução foi titulada com hidróxido de sódio 0,5 M, sendo o volume gasto de titulante registado para cálculos posteriores. O teor de proteína é quantificado utilizando-se o valor de 6,25 como factor de conversão.

### **1.9.4. Determinação de Cinzas**

A quantificação das cinzas foi efectuada de acordo com o método oficial da AOAC 923.03. Cerca de 5 g de cada amostra (grão inteiro, partido, laminado e extrudido e farinha) foram rigorosamente pesados para cápsulas de cerâmica previamente taradas, sendo colocadas numa mufla (Thermolyne, 48000 Furnace, Rochester, NY, EUA), onde a temperatura foi elevada até aos 550°C de forma gradual. As amostras permaneceram na mufla até se transformarem num pó muito fino cinza claro, sendo seguidamente colocadas num exsiccador, arrefecidas e por fim pesadas.

### **1.9.5. Determinação de Acidez**

A determinação da acidez foi efectuada segundo o método recomendado pela NP EN ISO 660 (1999). Foram pesados cerca de 5 g de cada amostra de óleo (cru,

neutralizado, lavado, branqueado e desodorizado) e colocados dentro de um matraz de 250 mL. Dissolveu-se cada toma em 100 mL de uma solução dissolvente composta por éter etílico / álcool etílico 95% a 50/50 (v/v) e adicionaram-se algumas gotas de solução de fenolftaleína como indicador do pH. Titulou-se esta mistura com uma solução de hidróxido de sódio a 0,05 N até o aparecimento de cor rosada.

### 1.9.6. Composição em Ácidos Gordos

A composição em ácidos gordos foi determinada por cromatografia gasosa usando uma coluna capilar e detecção por ionização em chama (GC/FID) segundo o método descrito na ISO 5509 (2000).

As soluções padrão de ácidos gordos incluíram: ésteres *cis*-9-*trans*-12-octadecadienoato de metilo ( $C_{18:2n6ct}$ ), *trans*-9-*cis*-12-octadecadienoato de metilo ( $C_{18:2n6tc}$ ) e *cis*-11-octadecenoato de metilo ( $C_{18:1n7}$ ) que foram adquiridos à Supelco (Bellefonte, PA, EUA). Ainda à mesma firma, foi adquirida uma mistura de 37 ésteres metílicos de ácidos gordos constituída por: butanoato ( $C_{4:0}$ ), hexanoato ( $C_{6:0}$ ), octanoato ( $C_{8:0}$ ), decanoato ( $C_{10:0}$ ), undecanoato ( $C_{11:0}$ ), dodecanoato ( $C_{12:0}$ ), tridecanoato ( $C_{13:0}$ ), tetradecanoato ( $C_{14:0}$ ), pentadecanoato ( $C_{15:0}$ ), hexadecanoato ( $C_{16:0}$ ), heptadecanoato ( $C_{17:0}$ ), octadecanoato ( $C_{18:0}$ ), eicosanoato ( $C_{20:0}$ ), heneicosanoato ( $C_{21:0}$ ), docosanoato ( $C_{22:0}$ ), tricosanoato ( $C_{23:0}$ ), tetracosanoato ( $C_{24:0}$ ), *cis*-9-tetradecenoato ( $C_{14:1}$ ), *cis*-10-pentadecenoato ( $C_{15:1}$ ), *cis*-9-hexadecenoato ( $C_{16:1}$ ), *cis*-10-heptadecenoato ( $C_{17:1}$ ), *trans*-9-octadecenoato ( $C_{18:1n9t}$ ), *cis*-9-octadecenoato ( $C_{18:1n9}$ ), *cis*-11-eicosenoato ( $C_{20:1}$ ), *cis*-13-docosenoato ( $C_{22:1n9}$ ), *cis*-15-tetracosenoato ( $C_{24:1n9}$ ), *trans*-9,12-octadecadienoato ( $C_{18:2n6tt}$ ), *cis*-9,12-octadecadienoato ( $C_{18:2n6}$ ), *cis*-6,9,12-octadecatrienoato ( $C_{18:3n6}$ ), *cis*-9,12,15-octadecatrienoato ( $C_{18:3n3}$ ), *cis*-11,14,eicosadienoato ( $C_{20:2n6}$ ), *cis*-8,11,14-eicosatrienoato ( $C_{20:3n6}$ ), *cis*-11,14,17-eicosatrienoato ( $C_{20:3n3}$ ), *cis*-5,8,11,14-eicosatetraenoato ( $C_{20:4n6}$ ), *cis*-13,16-docosadienoato ( $C_{22:2n6}$ ), *cis*-5,8,11,14,17-eicosapentenoato ( $C_{20:5n3}$ ) e *cis*-4,7,10,13,16,19-docosahexenoato ( $C_{22:6n3}$ ) de metilo. A solução metanólica de trifluoreto de boro a 14% ( $BF_3/MeOH$ ) utilizada na obtenção de esteres metílicos foi adquirida à empresa Sigma (St. Louis, MO, EUA).

Pipetaram-se 50  $\mu$ L de cada amostra (Figura 5) para um frasco de 4 mL (Supelco, Bellefonte, PA, EUA), adicionando-se a cada toma de óleo, 3 mL de isoctano e 200  $\mu$ L de hidróxido de potássio 2 M. Cada mistura foi sujeita a agitação por vórtex durante 1 minuto. Em seguida, adicionou-se cerca de 1 g de hidrogenossulfato de sódio permitindo a neutralização da solução de hidróxido de potássio. Por fim, deixou-

se repousar por um período de tempo suficiente para que a camada de isoctano se separasse da fase aquosa. Transferiu-se para um novo frasco escuro de 2 mL (Supelco, Bellefonte, PA, EUA), sendo depois conduzido para o injector automático do GC/FID, composto por:

- ✓ Cromatógrafo Chrompack CP 9001 (Chrompack, Middelburg, Holanda) com injector “split-splitless”;
- ✓ Detector de ionização de chama (FID);
- ✓ Injector automático CP-9050;
- ✓ Coluna capilar de sílica fundida CP-Sil 88 (Chrompack, Middelburg, Holanda) (50 m x 0,25 mm d.i., 0,19 µm de espessura de filme).

Para as condições analíticas definiu-se o seguinte método:

- ✓ Temperatura do injector 230 °C;
- ✓ Temperatura da coluna 160 °C durante um minuto, programada para aumentar até 239 °C à velocidade de 4 °C/min, e permanecer a esta temperatura durante 10 min;
- ✓ Temperatura do detector 270 °C;
- ✓ Razão de “split” 1:50;
- ✓ Gás vector: hélio, à pressão interna inicial de 120 kPa;
- ✓ Volume de injeção 1,2 µL.

### **1.9.7. Composição em Tocoferóis e Tocotrienóis**

A composição em vitamina E (tocoferóis e tocotrienóis) foi determinada segundo o método descrito por Amaral (2005).

Os tocoferóis ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ) e os tocotrienóis ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ) foram adquiridos à Calbiochem (La Jolla, CA, EUA).

Nesta determinação foram utilizadas duas soluções stock: solução de BHT (butil-hidroxitolueno) obtida na Aldrich (Madrid, Espanha); e de Tocol (2-metil-2-(4,8,12-trimetiltridecil)croman-6-ol) obtido na (Matreya Inc., Pleasant Gap, PA, EUA). Foi preparada uma solução de BHT 10 mg/mL em n-hexano para HPLC da Merck (Darmstadt, Alemanha) e uma solução de Tocol 10 mg/mL em n-hexano, protegida da luz e guardada a 4°C.

Aos 2 g de cada amostra (grão inteiro, partido, laminado e extrudido) foram adicionados 100 mL de BHT 10 mg/mL, como antioxidante para extracção da gordura por Soxhlet. Após extracção, pesou-se rigorosamente cerca de 0,1 mg de óleo de todas as amostras correspondentes às fases de produção (Figura 5) para frascos



escuras de 4 mL (Supelco, Bellefonte, PA, EUA) e envolvidos em papel de alumínio para protecção da luz. Em seguida, adicionaram-se 75 µL de solução de Tocol 10 mg/mL, como padrão interno e n-hexano até perfazer um volume total de 2 mL.

As amostras foram colocadas em frascos escuros de 2 mL (Supelco, Bellefonte, PA, EUA) e colocadas no injector automático do HPLC, sendo o sistema cromatográfico utilizado, composto por:

- ✓ cromatógrafo Jasco (Tóquio, Japão) equipado com uma bomba Jasco (modelo PU-980);
- ✓ um injector automático Jasco (modelo AS-950) e um “loop” de 10 µL;
- ✓ detector de díodos (DAD) Jasco (modelo MD-910) acoplado em série com um detector de fluorescência Jasco (modelo FP-920) programado com  $\lambda$  (excitação) = 290 nm e  $\lambda$  (emissão) = 330 nm;
- ✓ coluna Inertsil 5 SI fase normal, 5 µm de tamanho de partícula, 250 x 3 mm, (Varian, Holanda) a operar à temperatura ambiente (~ 20°C).

As condições analíticas utilizadas para a determinação da composição em tocoferóis e tocotrienóis foram as seguintes:

- ✓ fase móvel composta por uma mistura de *n*-hexano e 1,4-dioxano na proporção 95,5-4,5 (v/v), com um fluxo de 0,7 mL/min, a operar em modo isocrático;
- ✓ volume de injeção de 10 µL;
- ✓ detecção por fluorescência: ganho 10; comprimento de onda de excitação a 290 nm e de emissão a 330 nm.

Os dados cromatográficos obtidos foram analisados com recurso ao Borwin-PDA Controller software (JMBS, França). Os compostos foram identificados por comparação dos tempos de retenção e dos espectros UV dos referidos tocoferóis e tocotrienóis. A quantificação dos compostos foi feita com base no sinal obtido pelo detector de fluorescência, utilizando o método do padrão interno.

### **1.9.8. Composição em Fitosteróis**

A composição em fitosteróis foi determinada segundo o método recomendado pela NP EN ISO 12228 (1999).

Os padrões de colestanol, colesterol, campesterol, estigmasterol,  $\beta$ -sitosterol,  $\beta$ -sitostanol e a betulina foram adquiridos à Sigma (St. Louis, MO, EUA). Os reagentes de derivatização, 1-metilimidazol e N-metil-N-(trimetilsilil)-heptafluorobutiramida

(MSHFBA) foram fornecidos pela Sigma e Macherey-Nagel (Düren, Alemanha), respectivamente. As placas de sílica e o óxido de alumínio 90 padronizado foram adquiridos à Merck (Darmstadt, Alemanha). Os restantes reagentes utilizados tinham grau de pureza “Pro analysis”.

A determinação dos fitosteróis foi efectuada por cromatografia gasosa e detecção por ionização de chama (GC/FID). A análise foi realizada em tomas de óleo de todas as etapas de produção do óleo (Figura 5). Após a adição de 1 mL de betulina (1,0 mg/mL em acetona) como padrão interno a 250 mg de cada amostra pesados rigorosamente, procedeu-se à saponificação com 10 mL de solução etanólica de hidróxido de potássio 0,5 M. A fracção insaponificável foi obtida por extracção em fase sólida com uma coluna de óxido de alumínio. Após eluição com 5 mL de etanol e 30 mL éter etílico, procedeu-se à concentração do extracto. A fracção correspondente aos esteróis totais foi isolada por cromatografia em camada fina, utilizando placas de sílica e *n*-hexano/éter dietílico (1:1, v/v) como eluente. As bandas separadas foram visualizadas e marcadas após aspersão com metanol, e os compostos foram extraídos (3 vezes) da sílica removida com a adição de 1 mL de álcool seguido de 5 mL de éter dietílico. O extracto foi transferido para um pequeno frasco com fundo cónico e levado à secura em corrente de azoto. Procedeu-se em seguida à sua derivatização, adicionando-se 100 µL da mistura de 1-metilimidazol e *N*-metil-*N*-(trimetilsilil)-heptafluorobutiramida (MSHFBA) (50mL + 1 mL, respectivamente), selaram-se os frascos e aqueceu-se a 105 °C durante 15 min. O conteúdo dos frascos foi depois analisado por GC/FID.

Utilizou-se o mesmo sistema cromatográfico (GC-FID) descrito na análise de ácidos gordos, com uma coluna capilar DB-5MS (30 m x 0,25 mm d.i.) (J&W Scientific, Folsom, CA, EUA) e as seguintes condições analíticas:

- ✓ temperatura do injector 320 °C;
- ✓ temperatura do detector 320 °C;
- ✓ temperatura da coluna programada para aumentar de 250 °C até 300 °C à velocidade de 2 °C/min, e permanecer a 300 °C durante 12 min;
- ✓ relação de “split” 1:50;
- ✓ gás vector: hélio, à pressão interna inicial de 100 kPa;
- ✓ volume de injeção 1,5 µL.

O teor em esteróis foi calculado segundo a norma NP EN ISO 12228 (1999). A identificação dos compostos foi efectuada por comparação com os tempos de retenção obtidos para os padrões. O clerosterol,  $\Delta^5$ -avenasterol,  $\Delta^7$ -estigmasterol e  $\Delta^7$ -avenasterol, foram identificados com base em dados bibliográficos (NP EN ISO

12228, 1999; Firestone e Reina, 1996) e em dados obtidos com amostras de óleos descritos na literatura com elevados teores destes compostos (óleos de girassol e de palma). Sabendo que o  $\beta$ -sitostanol e o  $\Delta^5$ -avenasterol têm, aproximadamente, o mesmo tempo de retenção, a soma dos dois compostos foi quantificada como  $\Delta^5$ -avenasterol.



## 1.10. Caracterização Química do Óleo de Soja GM

### 1.7.1. Análise Nutricional

As amostras sólidas provenientes das etapas preparativas para a extracção de óleo de soja (grão inteiro, partido, laminado e extrudido) e do subproduto da extracção do mesmo (farinha) foram submetidas a uma avaliação nutricional, que consistiu nas determinações da humidade, cinzas, gordura total, proteínas e hidratos de carbono (Tabela 6). Nos óleos provenientes das etapas de refinação, determinou-se a acidez, cujos valores se apresentam na (Tabela 7).

**Tabela 6** – Análise nutricional das sementes de soja nas etapas preparativas da extracção do óleo de soja e subproduto de extracção do mesmo (farinha) (média  $\pm$  desvio padrão em %).

Amostras de soja	Gordura Total (%)	Proteínas (%)	Hidratos de Carbono (%)	Humidade (%)	Cinzas (%)
Grão GM	16,7 $\pm$ 0,2	36,8 $\pm$ 0,3	32,8 $\pm$ 0,3	7,69 $\pm$ 0,27	4,62 $\pm$ 0,03
Grão Partido GM	17,9 $\pm$ 0,1	36,1 $\pm$ 0,9	31,9 $\pm$ 0,9	7,75 $\pm$ 0,28	4,83 $\pm$ 0,07
Grão Laminado GM	21,1 $\pm$ 0,2	37,5 $\pm$ 0,5	26,0 $\pm$ 0,5	8,39 $\pm$ 0,17	4,90 $\pm$ 0,01
Grão Extrudido GM	20,5 $\pm$ 0,3	35,3 $\pm$ 0,2	29,2 $\pm$ 0,3	8,24 $\pm$ 0,31	4,85 $\pm$ 0,13
Farinha GM	1,01 $\pm$ 0,16	45,4 $\pm$ 0,1	36,4 $\pm$ 0,3	11,15 $\pm$ 0,27	5,96 $\pm$ 0,09

**Tabela 7** – Acidez das amostras de óleo das diferentes etapas de refinação (média  $\pm$  desvio padrão em %).

Amostras de soja	Acidez (%)
Óleo Cru	0,77 $\pm$ 0,03
Óleo Neutralizado	0,26 $\pm$ 0,01
Óleo Lavado	0,11 $\pm$ 0,00
Óleo Branqueado	0,28 $\pm$ 0,00
Óleo Desodorizado	0,08 $\pm$ 0,00

Os valores de humidade nas várias etapas preparativas para a extracção de óleo de soja são na ordem dos 8% e no subproduto da extracção do mesmo (farinha) de 11%. A manutenção deste valor ( $\sim$ 8%) é importante para a extracção efectiva do óleo. A farinha (subproduto sem gordura) tem teores de humidade ligeiramente superiores. De acordo com a Tabela 6 verificou-se que o teor de gordura aumenta com

o grau de quebra do grão. Este facto explica-se pela maior facilidade de extracção da gordura pelo solvente. Verifica-se que a extracção foi de facto efectiva, pois a farinha GM (subproduto da extracção) resultante ficou apenas com 1% de gordura. Com estes valores também se justifica a utilidade de cada fase de preparação da amostra para a extracção da gordura.

O teor em cinzas de todas as amostras (grão inteiro, partido, laminado, extrudido e farinha) está em conformidade com o intervalo de valores de referência [4,53-6,23%] (Harrigan et al., 2007) definidos para a semente convencional.

As sementes apresentam um ligeiro aumento no teor total em gordura face aos valores de referência para esta característica [15,16-20,28%] nas sementes convencionais. Este facto resultará do processo de preparação para a extracção do óleo (grão inteiro ao extrudido, Figura 5), a que cada uma das etapas analisadas é submetida, reforçando o argumento de que uma boa preparação da amostra permite um maior rendimento na extracção do óleo.

Os hidratos de carbono foram calculados por diferença, de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{Hidratos de Carbono} = 100 - (\% \text{Humidade} + \% \text{Cinzas} + \% \text{Proteína} + \% \text{Gordura})$$

Nas amostras de óleo (cru ao desodorizado, Figura 5) foram determinados os ácidos gordos livres, ou seja, a acidez. A NP 1539 de 2004 define um valor máximo de 0,2% de acidez para o óleo de soja comercializado para alimentação humana. Como era esperado, o teor em ácidos gordos livres diminuiu de 0,77 para 0,26% no óleo neutralizado, uma vez que estes são removidos sob a forma de sabões durante esta etapa. Durante o branqueamento ocorreu um aumento no teor de ácidos gordos livres, possivelmente devido à hidrólise dos triacilgliceróis causada pelo uso de terras activadas a elevadas temperaturas. A desodorização contribuiu para uma diminuição da acidez atingindo um valor final de 0,08%, o que correspondeu quase a 90% de redução. Estes resultados estão de acordo com os anteriormente demonstrados por Jung e colaboradores (1989). O valor de acidez para o óleo final obedece ao referido na norma, que não refere ser óleo de sementes de soja convencionais ou geneticamente modificadas.

Da análise nutricional pode-se referir que, as sementes GM não parecem diferir significativamente das sementes convencionais, no entanto, seria necessário um estudo mais exaustivo para comprovar os resultados obtidos. De referir que, por informação da empresa produtora do óleo de soja, aquando da recolha das amostras, a escolha de sementes GM recai sobre o facto de cada lote de semente GM produzir

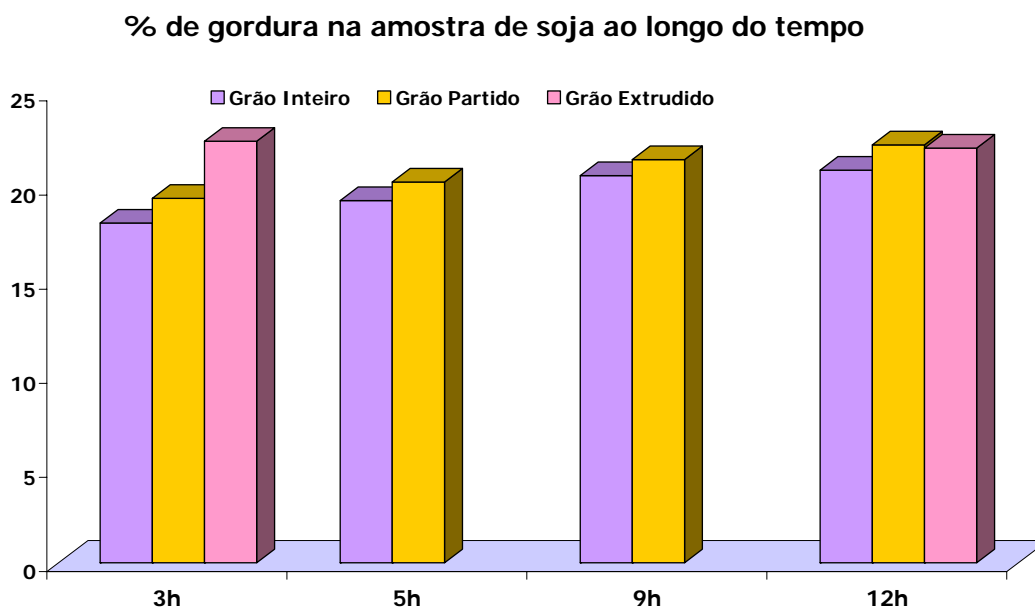
sempre, sensivelmente, a mesma quantidade de óleo, enquanto os lotes de sementes convencionais são mais variáveis. É ainda de referir que, actualmente, a oferta de soja GM é muito maior que a soja convencional. Por outro lado, as sementes de soja GM usadas nestas amostras incluem apenas uma alteração genética que permite tolerância ao herbicida, não se esperando qualquer diferença quando à composição química das mesmas.

### **1.7.2. Gordura Total**

Todas as amostras provenientes das etapas preparativas para a extracção de óleo de soja e do subproduto da extracção do mesmo (farinha) (Figura 5) foram submetidas à extracção de gordura em Soxhlet.

De acordo com a NP EN ISO 659 de 1998 a percentagem de óleo esperada ronda os 21%, o que foi constatado pela extracção experimental efectuada neste estudo. A etapa imediatamente anterior à extracção do óleo (grão extrudido) revelou um teor em gordura que ronda os 21%, pelo que o valor determinado está em concordância com o esperado numa semente convencional.

Por outro lado, os ensaios efectuados com diferentes tempos de extracção das amostras de grão em Soxhlet evidenciaram a importância das etapas preparativas na fase da pré-extracção (Figura 6). A gordura total extraída das 2 amostras correspondentes às etapas iniciais (grão inteiro e partido) aumentou ao longo dos tempos de extracção testados (3, 5, 9 e 12h), ou seja, atingindo ao fim de 12h de extracção um teor de gordura que rondou os valores esperados (~21%) (Figura 6). Este facto revelou que, de forma a evitar a utilização de períodos prolongados de extracção das sementes com o solvente, foram desenvolvidas etapas intermédias, visando a maximização da extracção da gordura e, deste modo, a rentabilização do processo de extracção. A semente de soja extrudida apresentou sensivelmente a mesma percentagem de gordura após um período de extracção por Soxhlet de 3h ou 12h, o que evidencia que esta etapa preparativa foi optimizada, maximizando o rendimento de extracção do óleo.



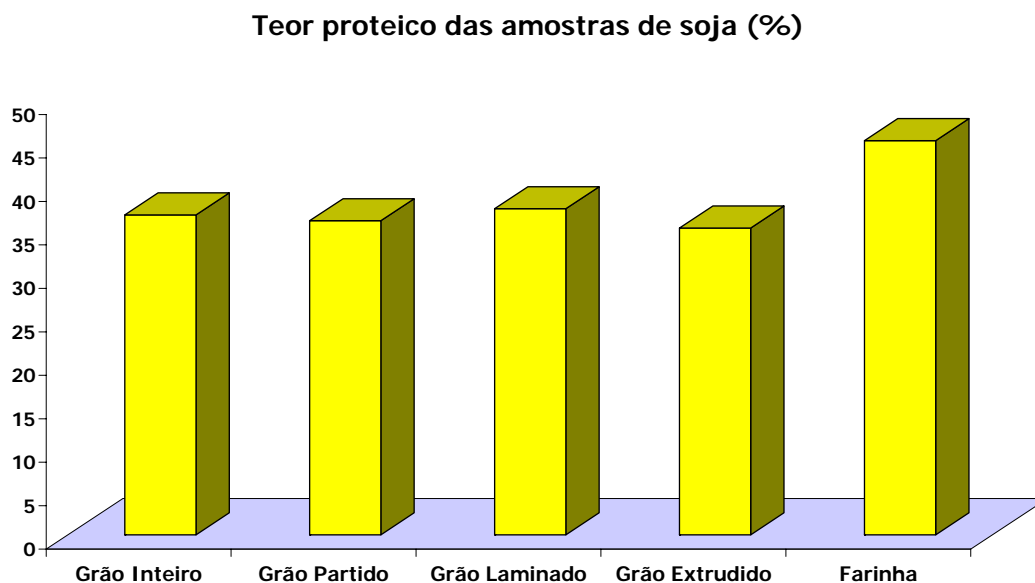
**Figura 6** – Percentagem de gordura extraída das amostras de soja correspondentes às 3 etapas de preparação para a extracção do óleo de soja (grão inteiro, partido e extrudido), ao longo do tempo.

### 1.7.3. Proteínas

A quantidade de proteína das amostras não sofreu alterações significativas ao longo das etapas preparativas para a extracção do óleo de soja, como era esperado. A farinha, após extracção da gordura apresenta 45% de proteína (Figura 7). A elevada quantidade de proteína presente nas farinhas de soja justifica a sua ampla utilização na alimentação animal. Esta matéria-prima é ainda muitas vezes enriquecida com lecitina, que constitui a fracção fosfolipídica retirada ao longo da refinação do óleo de soja.

Dada a elevada quantidade de proteína das sementes de soja torna-se evidente o uso preferencial desta matéria-prima como fonte de proteína tanto na alimentação humana como animal, sendo o óleo um subproduto muito utilizado. A soja geneticamente modificada apresentou um teor proteico dentro dos intervalos de referência para a soja convencional [32,45-42,50%] (Harrigan et al., 2007), pelo que em termos de quantidade proteica, este tipo de semente não parece apresentar variações em relação à semente convencional.





**Figura 7** – Percentagem proteína determinada nas amostras das etapas de preparação para a extracção do óleo de soja e ao subproduto do mesmo (farinha) de soja.

#### 1.7.4. Composição em Ácidos Gordos

Para a determinação da composição de ácidos gordos, utilizou-se uma mistura padrão de 37 ésteres metílicos de ácidos gordos para a sua identificação. Foram analisadas 9 amostras correspondentes às etapas de preparação, de extracção e de refinação do óleo de soja (Figura 5), sendo apenas usados os valores dos ácidos gordos mais representativos. A Figura 8 apresenta um cromatograma de uma das amostras analisadas (grão de soja extrudido), como exemplo dos cromatogramas obtidos nas análises efectuadas.

A Tabela 8 resume a composição em ácidos gordos das amostras em estudo. A soja contém um elevado teor de ácido linoleico ( $C_{18:2}$ ), na ordem dos 52%. O segundo ácido gordo com maior contributo é o ácido oleico com cerca de 25%, representando em conjunto perto de 80% do total da fracção saponificável.

As amostras de soja apresentam um perfil de ácidos gordos saturados, mono e polinsaturados muito semelhante entre si ao longo das diferentes etapas de preparação, extracção e refinação, verificando-se apenas um aumento estatisticamente significativo ( $P < 0,05$ ) no teor de ácidos gordos *trans* na última etapa da refinação do óleo (Tabela 8). Este factor é comum à refinação de outros óleos vegetais tais como o de girassol (Tasan e Demirci, 2003; Ortega-García et al., 2006, e Van Hoed et al., 2006). A desodorização corresponde à etapa em que o óleo é

submetido a uma temperatura de 240°C, a uma pressão de 2 mbar durante 2h, com o objectivo de eliminar odores e sabores desagradáveis. Estas condições a que o óleo é sujeito durante a refinação serão a explicação possível para o aumento da composição em ácidos gordos *trans*. Apesar de estarem descritos alguns efeitos adversos relacionados com a ingestão de ácidos gordos *trans* (Oomen et al., 2001), os teores no óleo de soja final são baixos (<1%), pelo que, não deverão ser motivo de preocupação relativa à saúde humana.



**Figura 8** – Cromatograma obtido na análise da amostra de grão de soja extrudido.

O óleo de soja produzido a partir de sementes GM apresenta assim, um comportamento semelhante ao esperado num óleo de soja obtido a partir de sementes convencionais. A composição em ácidos gordos está no intervalo definido no Dec.-Lei nº 106/2005.

**Tabela 8** – Composição em ácidos gordos (percentagens relativas) das amostras de soja ao longo da cadeia de produção do óleo (média ± desvio padrão).

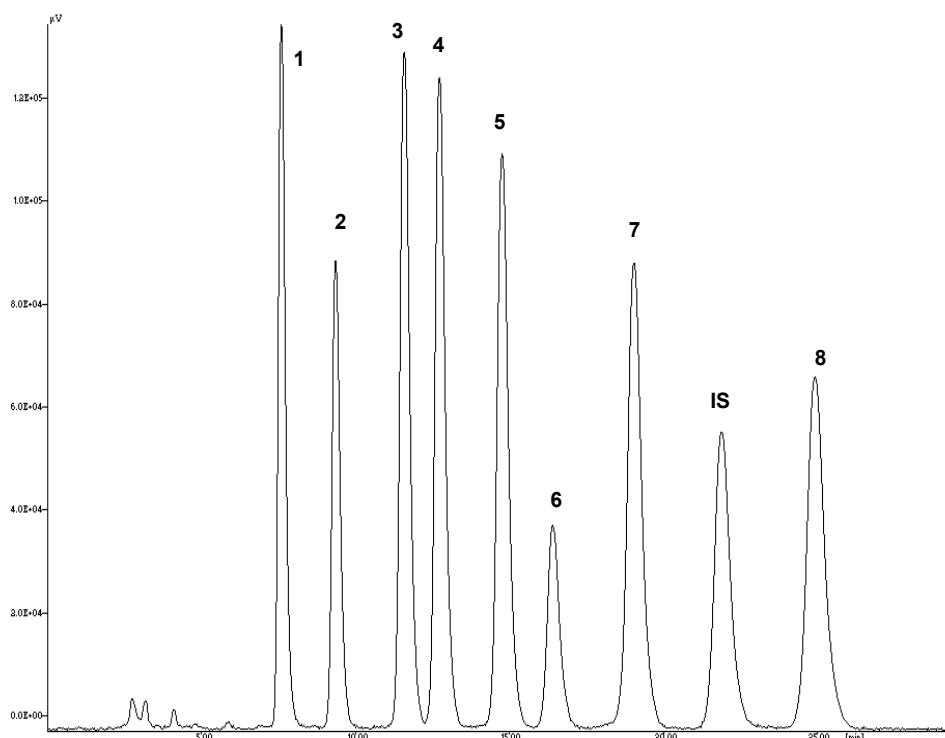
Ácidos Gordos	AMOSTRAS DE GRÃOS				AMOSTRAS DE ÓLEO				
	Grão Inteiro	Grão Partido	Grão Laminado	Grão Extrudido	Óleo Cru	Óleo Neutralizado	Óleo Lavado	Óleo Branqueado	Óleo Desodorizado
<b>C14:0</b>	0,11 ± 0,02	0,09 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,00
<b>C16:0</b>	10,83 ± 0,03	10,88 ± 0,03	11,03 ± 0,02	11,02 ± 0,04	10,82 ± 0,04	11,04 ± 0,01	11,08 ± 0,03	11,20 ± 0,03	11,13 ± 0,01
<b>C16:1n7c</b>	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,09 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,00
<b>C17:0</b>	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,09 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01
<b>C17:1n7c</b>	0,05 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,01
<b>C18:0</b>	3,45 ± 0,01	3,46 ± 0,01	3,46 ± 0,02	3,54 ± 0,14	3,44 ± 0,01	3,44 ± 0,04	3,46 ± 0,01	3,52 ± 0,01	3,48 ± 0,01
<b>C18:1n9t</b>	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01
<b>C18:1c</b>	25,44 ± 0,08	25,16 ± 0,22	25,15 ± 0,20	24,89 ± 0,17	25,01 ± 0,16	24,84 ± 0,16	24,83 ± 0,21	24,80 ± 0,17	24,95 ± 0,07
<b>C18:2n6tt</b>	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,61 ± 0,01
<b>C18:2n6cc</b>	51,98 ± 0,06	52,16 ± 0,27	51,97 ± 0,15	52,07 ± 0,17	52,28 ± 0,20	52,90 ± 0,18	52,90 ± 0,21	52,74 ± 0,18	52,96 ± 0,19
<b>C18:3n3c</b>	6,59 ± 0,02	6,66 ± 0,02	6,60 ± 0,05	6,81 ± 0,32	6,71 ± 0,04	6,06 ± 0,04	6,03 ± 0,02	6,02 ± 0,03	5,03 ± 0,01
<b>C20:0</b>	0,36 ± 0,00	0,37 ± 0,00	0,37 ± 0,01	0,38 ± 0,02	0,37 ± 0,01	0,37 ± 0,01	0,37 ± 0,01	0,38 ± 0,00	0,37 ± 0,00
<b>C20:1n9c</b>	0,21 ± 0,00	0,21 ± 0,00	0,21 ± 0,00	0,24 ± 0,04	0,21 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,21 ± 0,00	0,21 ± 0,00	0,37 ± 0,01
<b>C22:0</b>	0,46 ± 0,00	0,47 ± 0,00	0,48 ± 0,01	0,49 ± 0,02	0,46 ± 0,01	0,48 ± 0,01	0,48 ± 0,01	0,49 ± 0,01	0,49 ± 0,00
<b>C22:1n9c</b>	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,00
<b>C24:0</b>	0,16 ± 0,02	0,15 ± 0,01	0,17 ± 0,02	0,18 ± 0,03	0,16 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,15 ± 0,00	0,15 ± 0,00
<b>AG Saturados (SFA)</b>	15,47 ± 0,07	15,51 ± 0,04	15,72 ± 0,04	15,81 ± 0,08	15,46 ± 0,06	15,67 ± 0,04	15,72 ± 0,02	15,93 ± 0,03	15,80 ± 0,04
<b>AG monoinsaturados (MUFA)</b>	25,89 ± 0,08	25,62 ± 0,22	25,63 ± 0,27	25,41 ± 0,29	25,48 ± 0,14	25,31 ± 0,17	25,29 ± 0,20	25,27 ± 0,16	25,58 ± 0,05
<b>AG polinsaturados (PUFA)</b>	58,62 ± 0,05	58,87 ± 0,25	58,63 ± 0,11	58,95 ± 0,11	59,05 ± 0,15	59,01 ± 0,15	58,99 ± 0,19	58,81 ± 0,16	58,59 ± 0,17
<b>AG insaturados <i>Trans</i></b>	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,09 ± 0,00	0,11 ± 0,02	0,66 ± 0,03

### 1.7.5. Composição em Tocoferóis

Nos óleos vegetais, os triacilgliceróis são os constituintes principais, com cerca de 98%, no entanto, componentes minoritários tais como a vitamina E e os fitosteróis são de suma importância. Ambos os componentes têm sido relatados com benéficos para a saúde; os fitosteróis, por intervirem positivamente nos níveis de colesterol no sangue (Quílez et al., 2003) e a vitamina E por ser um poderoso antioxidante, responsável por diversas funções fisiológicas e bioquímicas (Sayago et al., 2007). Por outro lado, estes compostos têm importância tecnológica, uma vez que, actuam como antioxidantes melhorando a estabilidade dos óleos vegetais. Para a análise da composição em tocoferóis e tocotrienóis (Vitamina E) utilizaram-se 8 isómeros como padrões para a quantificação destes nas 9 amostras de óleo em estudo. A Figura 9 representa um cromatograma dos padrões obtido por HPLC/FL.

Os tocoferóis e tocotrienóis, mais vulgarmente designados por vitamina E, são constituintes de grande interesse nos óleos vegetais. Estes compostos são potentes antioxidantes, e como tal, pretende-se que permaneçam em elevadas quantidades nos produtos alimentares. O óleo de soja é uma excelente fonte de tocoferóis, pelo que se torna essencial a sua preservação ao longo da refinação. Estes e outros constituintes podem ser perdidos ao longo das etapas de refinação dos óleos vegetais, especialmente se forem utilizadas condições menos adequadas. O processo de extracção e refinação a que o óleo é sujeito, influencia a quantidade de vitamina E no produto final. Pela Tabela 9, verifica-se que os teores de tocoferóis estão relacionados com o teor de gordura extraída. Os teores totais vão aumentando com a diminuição da granulação das amostras. As amostras são especialmente ricas em  $\gamma$  e  $\delta$  tocoferóis, sendo possível, no entanto, detectar e quantificar os isómeros  $\alpha$  e  $\beta$  (Tabela 9). Pelo contrário, não apresentam tocotrienóis na sua composição. Os valores para os tocoferóis obtidos estão de acordo os intervalos de referência definidos no Dec. Lei nº 106/2005. Tal como já foi anteriormente verificado, o facto de serem utilizadas sementes geneticamente modificadas na produção do óleo de soja não desviou o seu teor em tocoferóis relativamente aos intervalos definidos para a soja convencional.

O óleo cru apresentou um teor total de tocoferóis de 1344 mg/kg de óleo. Ao longo da refinação este valor diminuiu cerca de 30%, tendo o óleo desodorizado atingido o valor de 924 mg/kg (Tabela 9). Estes resultados revelaram uma redução de 30% no teor em vitamina E face aos 46% de perdas, relatados noutros estudos durante a refinação química (Verleyen et al., 2002).



**Figura 9** – Cromatograma da mistura de padrões de tocoferóis e tocotrienóis obtido por HPLC/FL: **1.**α-tocopherol, **2.**α-tocotrienol, **3.**β-tocopherol, **4.**γ-tocopherol: **5.**β-tocotrienol, **6.**γ-tocotrienol, **7.**δ-tocopherol, **8.**δ-tocotrienol, assim como do padrão interno; **IS.** tocol.

**Tabela 9** – Composição em tocoferóis (mg/kg de óleo) das amostras de soja recolhidas ao longo da cadeia de produção do óleo de soja (média ± desvio padrão).

Amostras de Soja	Tocopheróis (mg/kg) de óleo				
	α-Tocopherol	β-Tocopherol	γ-Tocopherol	δ-Tocopherol	Total
<b>Grão</b>					
<b>Inteiro</b>	74,72 ± 7,59	13,01 ± 0,44	699,87 ± 21,02	401,92 ± 19,35	1189,53 ± 32,33
<b>Partido</b>	67,10 ± 0,13	12,98 ± 0,35	738,77 ± 6,74	429,24 ± 1,78	1248,13 ± 9,01
<b>Laminado</b>	77,14 ± 5,86	16,12 ± 1,28	798,86 ± 45,84	478,60 ± 4,01	1370,72 ± 56,99
<b>Extrudido</b>	74,87 ± 2,61	15,26 ± 0,24	797,67 ± 15,47	478,94 ± 8,04	1366,75 ± 25,87
<b>Óleo</b>					
<b>Cru</b>	75,22 ± 4,11	15,03 ± 0,96	788,88 ± 41,95	464,69 ± 26,09	1343,82 ± 25,50
<b>Neutralizado</b>	83,01 ± 2,24	12,83 ± 0,78	658,70 ± 17,73	324,07 ± 7,30	1078,61 ± 28,05
<b>Lavado</b>	83,84 ± 0,20	13,11 ± 0,27	663,91 ± 0,21	327,07 ± 1,40	1087,93 ± 1,67
<b>Branqueado</b>	82,63 ± 1,98	12,46 ± 0,40	645,69 ± 5,91	321,96 ± 3,48	1062,74 ± 11,76
<b>Desodorizado</b>	77,10 ± 1,50	11,09 ± 0,10	576,48 ± 13,59	277,71 ± 2,47	924,37 ± 17,65

A etapa da neutralização foi onde se verificou a diminuição mais acentuada no conteúdo de tocoferóis, a qual correspondeu a um decréscimo de cerca de 20% (1343 mg/kg de óleo cru para 1078 mg/kg de óleo neutralizado, Tabela 9). De relembrar que, esta fase inclui uma acidificação com ácido fosfórico, sendo depois neutralizada com

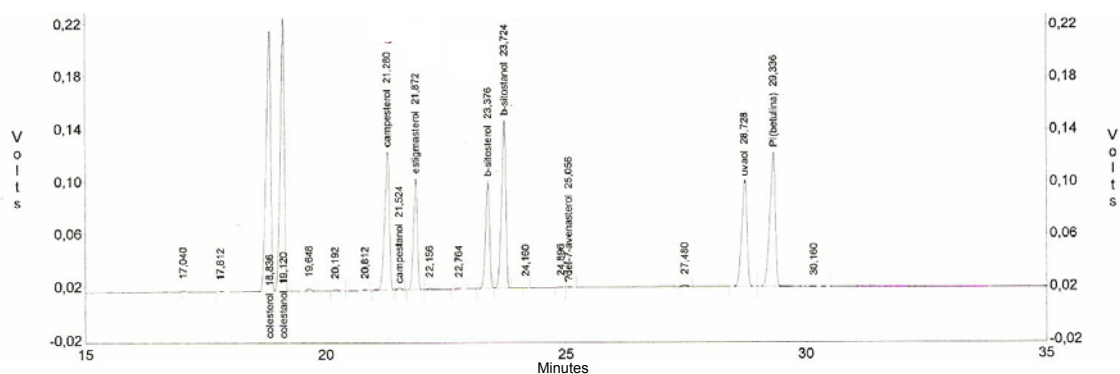
hidróxido de sódio. Esta perda elevada de tocoferóis é atribuída ao tempo de contacto do óleo com a soda, dada a sua instabilidade nestas condições (Tasan e Demirci, 2005).

Os outros 13% de perda de vitamina E ocorreram no último passo da refinação, a desodorização, passando de 1062 mg/kg no óleo branqueado para 924 mg/kg no óleo desodorizado (Tabela 9). Para a mesma etapa, Verleyen e colaboradores (2002) referem perdas na ordem dos 35%. Esta fase de desodorização envolve um período com temperatura elevada (240°C), facto que poderá levar às perdas verificadas. Esta fase, embora tenha como propósito a eliminação de compostos indesejáveis, também leva à eliminação de compostos de interesse, como o caso dos tocoferóis.

Actualmente, os países da Europa têm parâmetros de qualidade na produção dos óleos edíveis que incluem uma maior retenção de tocoferóis durante a refinação. Estas medidas visam a valorização dos benefícios para a saúde humana aquando da sua utilização. Os resultados obtidos parecem assim confirmar que os parâmetros utilizados na refinação química deste óleo permitiram a retenção de uma maior quantidade de tocoferóis totais.

### 1.7.6. Composição em Fitosteróis

Foram avaliadas 9 amostras relativas às etapas de produção do óleo. A Figura 10 representa um cromatograma dos padrões por GC/FID utilizados na determinação dos fitosteróis.



**Figura 10** – Cromatograma de fitosteróis correspondente à amostra de óleo cru obtido por GC/FID: campesterol; campestanol; estigmasterol; clerosterol; β-sitosterol; β-sitosterol + Δ<sup>5</sup>-avenasterol; Δ<sup>7</sup>-estigmasterol; Δ<sup>7</sup>-avenasterol e do padrão interno betulina.

Pela análise do teor total de fitosteróis verificou-se que os resultados obtidos estão dentro dos intervalos definidos para os fitosteróis totais num óleo de soja para consumo alimentar (Dec.-Lei nº 106/2005). Por outro lado, o uso de sementes GM na produção de óleo de soja não parece interferir com a quantidade total de fitosteróis do óleo refinado, uma vez que estes valores se encontram dentro do intervalo definido para as sementes convencionais.

Os efeitos verificados ao longo das etapas de produção do óleo de soja relativos ao teor total e individual de fitosteróis (% para os fitosteróis individuais e total de fitosteróis em mg/100g de óleo) estão representados na Tabela 10. Durante as etapas de preparação para a extracção do óleo de soja registou-se um aumento no teor total de fitosteróis (353 para 409 mg/100g de óleo), provavelmente atribuído à maior facilidade de extracção do óleo após extrusão (Tabela 6 e Figura 6). Ao longo das etapas de refinação observou-se uma diminuição no teor de fitosteróis totais (de 393 no óleo cru para 313 mg/100g no óleo desodorizado), sendo a etapa de neutralização a que causou o maior decréscimo. Esta diminuição foi também verificada por Verleyen e colaboradores (2002), contudo, foi bastante inferior (20%) aos 34% de perda registados por estes autores. Este facto permite também inferir acerca do melhoramento das condições actuais de extracção de óleos.

A perda mais significativa de fitosteróis totais ocorreu na etapa da neutralização e depois na lavagem com cerca de 10% e 5%, respectivamente. Ao contrário do que seria de esperar, o passo da desodorização não provocou uma diminuição significativa de fitosteróis, sofrendo a menor perda que correspondeu apenas a 1%. A diminuição de fitosteróis totais durante a neutralização correspondeu a 10%, em contraste com os 20% descritos noutros trabalhos (Verleyen et al., 2002). No entanto, esta perda deverá ocorrer por eliminação dos fitosteróis juntamente com os sabões durante a centrifugação que finaliza este passo da neutralização. De relembrar, que a concentração da soda neste processo é bastante elevada, criando uma elevada força iónica que poderá ajudar a remover alguns dos componentes desejáveis. Porém, estudos realizados por Verleyen e colaboradores (2002), revelaram que concentrações inferiores para a soda induziram perdas superiores no teor em fitosteróis durante este passo da refinação. Ainda que, sendo os fitosteróis bases livres muito fracas, o grupo hidroxilo não pode ser alcóxilado, ou seja, o grupo hidroxilo não perde o hidrogénio (Verleyen et al., 2002), mas parte destes compostos são eliminados uma vez que foram identificados na fracção dos sabões (Dowd, 1998).

**Tabela 10** – Composição em fitosteróis (% para fitosteróis individuais e fitosteróis totais em mg/100g de óleo) das amostras de Soja ao longo da cadeia de processamento do óleo (média  $\pm$  desvio padrão).

Amostras de soja	% de Fitosteróis individuais								Total	
	Colesterol	Campesterol	Campestanol	Estigmasterol	Clerosterol	β-sitosterol	Δ <sup>5</sup> -Avenesterol	Δ <sup>7</sup> -Estigmasterol	Δ <sup>5</sup> -Avenasterol	mg/100g óleo
Grão										
Inteiro	1,06 ± 0,01	18,52 ± 0,21	0,58 ± 0,02	18,75 ± 0,38	0,48 ± 0,03	51,84 ± 0,45	4,59 ± 0,62	3,23 ± 0,17	0,96 ± 0,27	352,7 ± 1,21
Partido	0,55 ± 0,02	19,09 ± 0,06	0,60 ± 0,03	19,85 ± 0,08	0,55 ± 0,02	51,94 ± 0,12	4,30 ± 0,11	2,03 ± 0,13	1,09 ± 0,09	378,7 ± 19,79
Laminado	0,46 ± 0,03	16,69 ± 0,14	0,51 ± 0,02	17,15 ± 0,20	0,49 ± 0,03	55,05 ± 0,42	4,26 ± 0,72	4,02 ± 0,51	1,38 ± 0,49	429,5 ± 27,20
Extrudido	0,47 ± 0,01	17,04 ± 0,16	0,51 ± 0,02	17,49 ± 0,39	0,52 ± 0,01	54,22 ± 0,68	4,40 ± 0,60	3,66 ± 0,53	1,70 ± 0,11	408,8 ± 21,62
Óleo										
Cru	0,47 ± 0,03	17,36 ± 0,15	0,51 ± 0,01	17,58 ± 0,55	0,49 ± 0,04	53,76 ± 0,06	4,65 ± 1,04	3,91 ± 0,16	1,27 ± 0,42	392,8 ± 10,13
Neutralizado	0,55 ± 0,05	15,74 ± 0,03	0,48 ± 0,02	17,38 ± 0,16	0,52 ± 0,01	53,35 ± 0,49	4,73 ± 0,53	5,83 ± 0,03	1,89 ± 0,10	343,4 ± 15,97
Lavado	0,66 ± 0,06	15,74 ± 0,14	0,53 ± 0,03	17,80 ± 0,11	0,54 ± 0,04	54,49 ± 0,73	3,43 ± 0,12	5,12 ± 0,54	1,63 ± 0,03	334,1 ± 1,14
Branqueado	0,45 ± 0,03	16,21 ± 0,04	0,58 ± 0,03	18,19 ± 0,22	0,43 ± 0,01	55,45 ± 0,31	2,78 ± 0,09	4,92 ± 0,48	1,00 ± 0,05	324,0 ± 16,53
Desodorizado	0,60 ± 0,06	15,88 ± 0,13	0,56 ± 0,04	17,65 ± 0,38	0,46 ± 0,06	55,86 ± 0,69	2,97 ± 0,54	5,00 ± 0,50	1,01 ± 0,08	312,6 ± 10,04



A segunda maior perda ocorre na etapa que se segue à neutralização, ou seja, a lavagem, onde após a adição da água a 80°C, se efectua uma nova centrifugação para remoção de sabões remanescentes e o excesso de soda. Deverá ser este conjunto de factores que se justificam parte da perda dos fitosteróis observada (cerca de 5%), já que se prevê que estes constituintes sejam removidos juntamente com os sabões (Sciancalepore, 1981). Ao longo dos anos, tem-se vindo a otimizar as etapas de refinação dos óleos vegetais de forma a preservar os fitosteróis no óleo vegetal ou alimentar, assim como os outros componentes de interesse.

Neste sentido, parece evidente que os métodos de produção recentes que têm vindo a ser implementados promovem uma maior retenção dos compostos desejáveis nos óleos vegetais, respondendo adequadamente ao melhoramento nutricional dos óleos como alimentos. Assim, a extracção química por solvente, juntamente com a optimização do processo de refinação, permite a obtenção de óleos vegetais de elevado valor comercial e nutricional.



# **CAPÍTULO 2**

---

## **Detecção de ADN em Óleos de Soja**



# PARTE TEÓRICA

---

## 2.1. Organismos Geneticamente Modificados

De acordo com a Directiva 2001/18/CE, “Organismo geneticamente modificado” (OGM) define-se como qualquer organismo, à excepção do ser humano, cujo material genético (ADN) tenha sido alterado de uma forma não natural, por meio de cruzamento e/ou de recombinação natural. Esta tecnologia é também designada como “biotecnologia moderna”, “tecnologia de genes”, “tecnologia de ADN recombinante” ou “engenharia genética”. Esta técnica possibilita a transferência individual de genes seleccionados de um organismo para outro, incluindo frequentemente espécies não relacionadas.

O avanço da engenharia genética tem promovido a optimização das mais variadas culturas, visando essencialmente, o controlo de características agronómicas em plantas utilizadas em alimentação humana e animal. Estas modificações resultam da inserção de novas características ou da inibição de funções nas novas culturas, resultando na tolerância a herbicidas, no aumento da resistência a pragas (insectos, vírus ou fungos) ou ainda na conjugação simultânea destas duas características (Mafra e Oliveira, 2004).

Actualmente, os potenciais benefícios desta nova biotecnologia estão bem definidos, embora continue a haver diversas questões pertinentes, levantadas pelo público em geral e/ou pela comunidade científica, a respeito do impacto ambiental e da segurança alimentar das culturas GM. Relativamente à avaliação do impacto ambiental são factores relevantes, o fluxo vertical ou horizontal de genes, o cruzamento com espécies selvagens, os efeitos na biodiversidade e o impacto da presença de material GM em culturas convencionais, a invasão de ecossistemas, as super-pragas e super-doenças e ainda os impactes ecológicos secundários (Conner et al., 2003).

No que respeita à avaliação da segurança de alimentos GM, esta tem-se fundamentado no conceito de equivalência substancial desenvolvido pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE, 1993). Baseia-se numa abordagem comparativa para identificar as possíveis diferenças entre os alimentos GM

e os convencionais, uma vez que estes últimos são considerados seguros, tendo por base a sua longa história de uso. Os alimentos provenientes de culturas convencionais são encarados como alimentos seguros dada a vasta experiência do seu consumo ao longo da história, ainda que determinados alimentos possam conter anti-nutrientes e substâncias tóxicas. A aplicação do conceito de equivalência substancial não constitui em si uma avaliação da segurança, mas permite a identificação de potenciais diferenças entre os alimentos existentes e os novos produtos GM. Por outro lado, estes produtos deverão ainda ser submetidos a uma investigação suplementar, no que respeita ao seu impacto toxicológico (Kuiper et al., 2002).

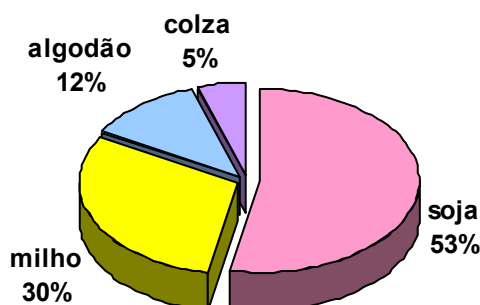
A avaliação da segurança de alimentos compreende quatro etapas, a caracterização da cultura mãe, a caracterização do processo de modificação genética, dos genes transferidos e do organismo fonte de ADN recombinante (König et al., 2004). Uma avaliação subsequente deve incluir estudos das proteínas recombinantes e dos novos metabolitos. Assim, a comparação entre culturas GM e convencionais serve para atestar a segurança das alterações pretendidas no alimento e demonstrar que da transformação genética não advêm efeitos não pretendidos e não esperados, os quais poderiam constituir possíveis impactes adversos na saúde.

Assim, é necessária uma avaliação de riscos alimentares, com base científica, para que os alimentos GM ou seus derivados possam ser utilizados e considerados seguros. A avaliação da segurança inclui a identificação e caracterização dos potenciais perigos, o risco de exposição e conseqüentemente a avaliação desses riscos (Cellini et al., 2004). Assim, a avaliação da segurança dos novos alimentos, incluindo os alimentos derivados de OGM, pretende demonstrar que estes novos alimentos são tão seguros quanto os alimentos convencionais e, como tal, não introduzem nenhum risco novo ou adicional para a saúde do consumidor (Cellini et al., 2004).

### **2.1.1. Soja Geneticamente Modificada**

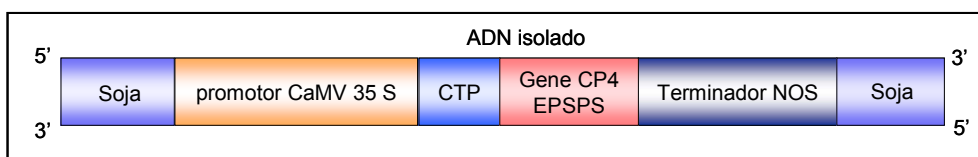
A soja (*Glycine max* L.) é a cultura geneticamente modificada mais importante da actualidade, representando cerca de 53% do total da área de OGM cultivados em todo o mundo (Figura 11) (James, 2008).

## Plantações GM em 2008



**Figura 11** – Principais plantações GM em 2008 (James, 2008).

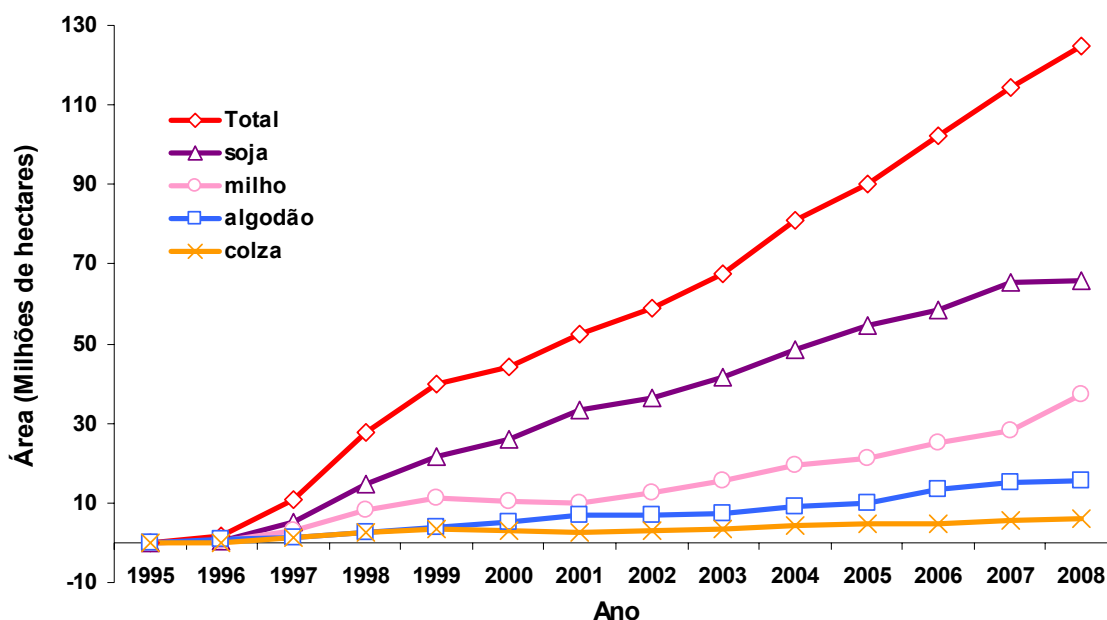
A soja Roundup Ready® foi desenvolvida durante os anos 80 pela Monsanto (St. Louis, MO, USA) com o intuito de se disponibilizar uma cultura de soja que fosse tolerante à acção dos herbicidas com base no glifosato, pois estes são largamente utilizados para controlar o aparecimento de vegetação invasora que provoca o subdesenvolvimento da cultura de interesse ou mesmo a morte desta. O glifosato é responsável pela inibição da enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), provocando o atraso no desenvolvimento da planta, alteração nos aminoácidos e consequente morte da planta. O evento GTS-40-3-2 contém o gene CP4 EPSPS que codifica a enzima com o mesmo nome presente nas bactérias do solo *Agrobacterium* sp. O gene de inserção (Figura 12) contém uma parte do promotor do Vírus do Mosaico da Couve-flor (CaMV 35S), seguido do péptido de cloroplasto da EPSPS (CTP EPSPS) da petúnia híbrida, a sequência codificadora CP4 EPSPS e parte do terminador NOS da nopalina sintetase da *Agrobacterium tumefaciens* (Padgett et al., 1996; Conceição et al., 2006).



**Figura 12** – Esquema simplificado do gene inserido na soja RR (adaptado de Padgett et al, 1996).

Actualmente, a soja continua a ser a cultura GM de maior relevância, dada a sua ampla implantação nos países com vastas áreas de culturas GM, destacando-se de entre os 25 países com culturas GM, os EUA, o Brasil e a Argentina como os seus

maiores produtores (James, 2008). Os 125 milhões de hectares de culturas GM em 2008 representam 8% dos 1,5 bilhões de hectares de terras cultiváveis no mundo (Figura 13). Estes dados representam um crescimento acentuado ao longo da última década, revelando a tendência crescente desta nova biotecnologia (James, 2008).



**Figura 13** – Evolução das principais plantações GM entre 1995-2008 (James, 2008).

As culturas com características como a resistência a insectos, tolerância a herbicidas ou a combinação simultânea destas duas características, domina, actualmente, todos os outros tipos de culturas GM. Apesar do milho e do algodão apresentarem uma produção total GM a aumentar nos últimos anos, continuam muito abaixo da soja GM (Figura 13).

Mundialmente, o milho tem cerca de 44 eventos aprovados, sendo seguido pelo algodão com 23 eventos autorizados, a colza e a soja com 14 e 8 eventos aprovados, respectivamente. Apesar do reduzido número de eventos aprovados para a soja, esta cultura é a mais largamente cultivada em todo o mundo. O evento que recebeu aprovação reguladora na maioria dos países foi o evento da soja tolerante a herbicida GTS-40-3-2 com 23 aprovações considerando os 27 países da UE como uma única aprovação, seguido pelo milho resistente a insectos (MON810) e pelo milho tolerante a herbicidas (NK603), ambos com 21 aprovações, e algodão resistente a insectos (MON531/757/1076) com 16 aprovações em todo o mundo (James, 2008).

Desta forma, pode-se inferir que os OGM fazem parte da alimentação diária de toda a população, incluindo a Portuguesa, sem que a maioria tenha consciência disso. Analisando alguns dos rótulos de óleos vegetais, pode-se verificar que grande parte



destes fazem referência à utilização de OGM matéria-prima. No mercado português encontram-se produtos cujos rótulos mencionam: “contendo OGM, constituídos por OGM ou produzidos a partir de OGM”. Embora a soja não seja o alimento de eleição dos portugueses, ela está presente nos mais variados produtos, principalmente nos óleos alimentares. O óleo de soja é utilizado misturado com outros óleos destinado à fritura, uma vez que o seu desempenho não é adequado num óleo estreme, devido ao seu elevado teor em ácido linolénico.

A soja é uma excelente fonte de óleo vegetal para a indústria alimentar e a oleoquímica. A soja não edível destina-se à produção de tintas, vernizes, resinas, plásticos e biodiesel. No entanto, a soja para fins industriais representava apenas 5% do total, em comparação com a usada para a produção de géneros alimentícios e alimentos para animais (Cahoon, 2003).

O óleo de soja representa uma parte muito significativa da produção mundial de óleos vegetais, cerca de 30%, apesar das sementes de oleaginosas que lhe dão origem conterem apenas 20% de matéria gorda. Num esforço para expandir a utilização destas sementes a nível industrial e alimentar, recorre-se cada vez mais a métodos de biotecnologia visando a alteração da composição em ácidos gordos (McKeon, 2003).

Os óleos de soja GM com elevado teor em ácido oleico (80-90%), à semelhança do azeite, são geralmente considerados mais saudáveis do que os óleos obtidos a partir da soja convencional, devido ao reduzido teor de ácidos gordos saturados e ao reduzido teor de ácido linolénico. A soja com elevado teor de ácido oleico é um dos tipos de culturas GM que se têm destinado ao uso na indústria alimentar (óleos vegetais), verificando-se nos últimos tempos um aumento na produção de novos tipos de sementes GM que respondam às crescentes necessidades do mercado actual.

### **2.1.2. OGM *versus* Alergenicidade**

Os potenciais riscos dos OGM para a saúde humana podem estar associados com toxicidade, alergenicidade, alterações nutricionais e efeitos anti-nutricionais. O maior problema da análise de risco de OGM reside na impossibilidade da previsão dos seus efeitos. Os riscos para a saúde humana podem incluir alergias e intolerância (Ladics e Selgrade, 2008).

Durante o século passado verificou-se um aumento crescente na procura dos óleos e gorduras vegetais, face às gorduras animais que até então dominavam o

consumo mundial. Este facto deveu-se principalmente ao avanço das novas tecnologias como a hidrogenação e o melhoramento de processos de extracção e de refinação dos óleos vegetais. Desde a segunda metade dos anos 70, o consumo de óleos vegetais tem ultrapassado o das gorduras animais, e ainda hoje lideram a preferência dos consumidores.

Actualmente, encontra-se disponível no mercado uma enorme variedade de produtos derivados de óleos vegetais, quer para consumo alimentar (margarinas, produtos de padaria e confeitaria, sopas, óleos de confecção alimentar) quer para a indústria química (sabonetes, cosméticos) (O'Brien, 2004).

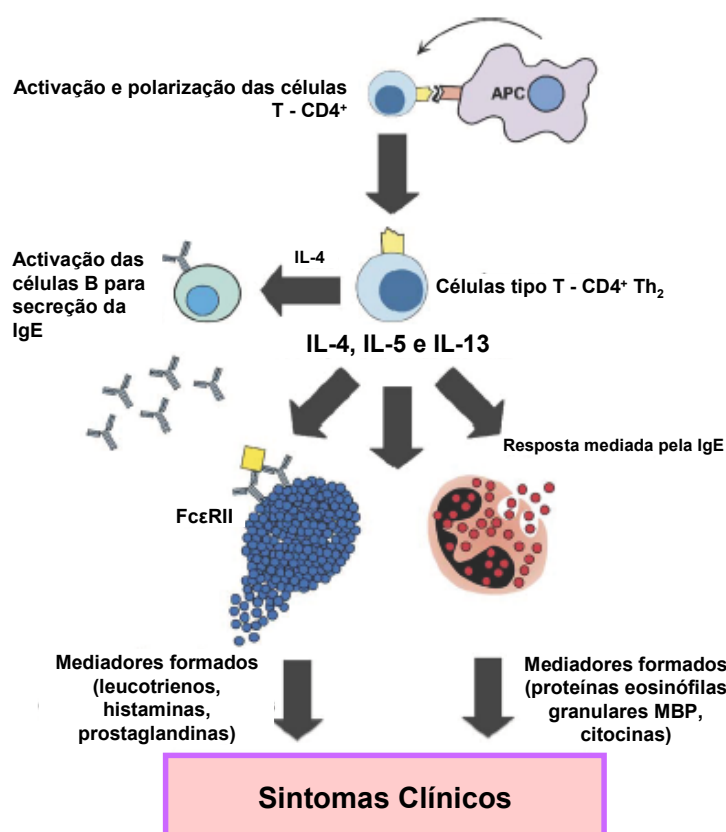
Apesar dos benefícios associados ao consumo de determinados óleos vegetais, estes podem conduzir ao aparecimento de reacções alérgicas, sendo exemplo destes casos, os óleos de amendoim e soja. Por outro lado, o aumento recorrente ao uso das sementes GM na produção de óleos vegetais tem vindo a causar algum alarme na opinião pública.

Quando um novo gene é introduzido numa planta, podem ocorrer três consequências relacionadas com a alergenicidade. Em primeiro lugar, quando um gene de interesse proveniente de um organismo é inserido numa planta, esse gene pode conter a informação para produção de proteínas alergénicas, podendo levar à sua expressão na planta. Para minimizar este risco devem ser consultadas todas as bases de dados correspondentes à sequenciação deste gene e realizadas comparações com as sequências de alergénios conhecidos (Barber et al., 2008). Em segundo lugar, a nova proteína expressa pode causar sensibilização no consumidor. O teste da estabilidade da pepsina pode ser utilizado como forma de reduzir a possibilidade da proteína ser um alergénio, dado que na maioria dos alergénios mais severos estes demonstram estabilidade às proteases (Astwood et al., 1996). A terceira consequência refere-se à possibilidade da introdução de um novo gene causar modificações na expressão dos genes já existentes (Barber et al., 2008).

Desta forma, os alimentos geneticamente modificados têm levantado inúmeras questões de segurança, nomeadamente, a possibilidade da inserção de novas proteínas na cadeia alimentar que possam resultar na introdução não intencional de novos alergénios alimentares e potenciar riscos para indivíduos susceptíveis.

Entende-se por alergia a um alimento a manifestação de reacções adversas devido a respostas imunológicas após ingestão do referido alimento (Matsuda e Nakamura, 1993). Estas reacções alérgicas aos alimentos são tipicamente mediadas pela Imunoglobulina E (IgE), ocorrendo em indivíduos com predisposição genética para desencadear reacções alérgicas e em indivíduos que tenham sido previamente sensibilizados ao alergénio (Sicherer, 2000). A exposição continuada de um indivíduo

sensível a um dado alérgeno veiculado por um alimento, pode desencadear uma resposta alérgica, devido à ligação da IgE ao antígeno específico para esta imunoglobulina, causando a libertação de diversos mediadores químicos. Estes mediadores (Figura 14) são os responsáveis pelo desencadeamento de vários sinais clínicos associados tipicamente a reacções alérgicas (inchaço, irritação cutânea, prurido, sintomas gastrointestinais e broncoconstrição, ou mesmo choque anafilático) devido à ingestão de determinados alimentos (Ladics e Selgrade, 2008).



**Figura 14** – Esquema representativo do processo inflamatório provocado pela reacção alérgica (Prescott e Hogan, 2006). As células T  $CD4^+$  são as responsáveis pela regulação da hipersensibilidade aos alimentos. Após a activação do antígeno as células  $Th_2$  produzem as IL-4, IL-5 e IL-13. IL-4 é utilizada para a maturação das células B e síntese da IgE. Estas interleucinas levam à formação de mediadores que provocam o aparecimento dos mais variados sintomas clínicos.

Estima-se que este tipo de reacções alérgicas mediadas pela IgE afecte cerca de 1-2% da população adulta (Sampson, 1997; Anderson, 1996) e cerca de 2-8% das crianças (Bock, 1987; Helm e Burks, 2000). Quando o organismo identifica algo estranho, diferente e ofensivo, reage em conformidade, provocando os mais variados sintomas. Considerando que todas as plantas GM têm sequências genéticas provenientes de outros organismos, as novas características expressas poderão ser identificados pelo organismo humano como potencialmente adversas. Com o

desenvolvimento das novas técnicas biotecnológicas, tem vindo a aumentar a preocupação face ao possível aparecimento de novos alimentos alergénicos.

As verdadeiras alergias alimentares também incluem reacções de hipersensibilidade mediadas por células, cujo mecanismo de acção é menos claro. Existe uma vasta lista de alimentos alergénicos associados a reacções alérgicas mediadas pela IgE estabelecidas pela Comissão do “Codex Alimentarius” e que inclui alimentos como: o amendoim, a avelã, a noz, o aipo, as sementes de mostarda e de sésamo, a soja, o leite, os ovos, os crustáceos e os cereais com glúten, entre os mais comuns. Cerca de 160 alimentos foram associados a reacções alérgicas (FAO/WHO; 2000), incluindo os alergénios identificados em frutos de casca rija e vegetais. Os alergénios alimentares são geralmente proteínas ou glicoproteínas (entre 10 e 70 kDa), contudo, apenas uma pequena percentagem das proteínas presentes nos alimentos são alergénicas (Besler et al., 2000).

A primeira forma e, talvez uma das mais eficazes, de tratar a hipersensibilidade alimentar visa a eliminação da ingestão dos alimentos que desencadeiam algum tipo de reacção alérgica (Khakoo e Lack, 2004). No entanto, evitar totalmente a ingestão de alimentos contendo alergénios, é uma tarefa praticamente impossível, dado que os produtos muito processados contêm, na maioria das vezes, um elevado número de ingredientes, incluindo os alergénios, na sua composição (Mafrá et al., 2008b).

Por estas razões, a introdução de plantas GM na cadeia alimentar humana contendo possíveis alergénios ou proteínas alergénicas desconhecidas podem constituir um risco para indivíduos sensíveis. Estas preocupações são reforçadas por estudos (Nordlee et al., 1996) que demonstraram que a alergenicidade pode ser transferível por modificação genética. Embora alguns autores indiquem que o milho e a soja transgénicos não apresentem alergenicidade detectável (Batista et al., 2005), outros investigadores contrariam essa tese (Padgett et al., 1996).

Um dos argumentos a favor da segurança dos transgénicos é a precisão da alteração genética, comparada com o melhoramento convencional de plantas que se processa de forma aleatória. O melhoramento convencional de plantas envolve a transferência de centenas de genes e a expressão potencial de novas proteínas. Estas variantes genéticas podem apresentar, em larga escala, alterações significativas na expressão de proteínas que, na maior parte das vezes, não suscitam interesse por parte dos investigadores.

A soja é uma das mais importantes fontes de proteínas para a alimentação humana e animal, sendo também considerada como uma das fontes de alergénios melhor caracterizadas (Gizzarelli et al., 2006). Na alimentação humana, destaca-se a soja como fonte de óleos vegetais, tendo nos últimos anos crescido o recurso à soja

GM para a produção destes. Das proteínas da soja que são consideradas alergénios destacam-se as de maior relevância: Gly m Bd 30K (tiol-protease P34); as proteínas de reserva glicínica,  $\beta$ -conglícinina, profilina (Gly m 3), Gly m 2 e o inibidor da tripsina-Kunitz (Cordle, 2004; Poms et al., 2004).

Um importante incidente ocorrido em meados da década de 90, que esteve relacionado com a introdução de um gene retirado da noz brasileira na soja transgénica (Nordlee et al., 1996), veio reforçar as opiniões e levantar novas questões contra o recurso da biotecnologia para a produção de alimentos GM para consumo humano e animal. Este tipo de soja transgénica foi uma tentativa de desenvolvimento de uma soja mais adequada para a alimentação animal, permitindo a obtenção de rações produzidas a partir de soja rica em metionina e evitando a necessidade de suplementar as rações com aminoácidos ricos em enxofre. Neste caso em particular, foi inserido na soja um gene que codifica uma das proteínas de armazenamento da noz brasileira, esta última conhecida pelo elevado teor no aminoácido essencial – metionina (Clive, 2005). O desenvolvimento deste produto foi abandonado quando ficou demonstrado que esta soja GM reagia com o soro obtido a partir de indivíduos previamente sensibilizados à noz brasileira, provando que o gene inserido na soja também permitia expressar o alergénio característico da noz.

Este incidente comprovou assim o perigo da transferência de alergénios entre espécies de plantas diferentes, promovendo uma intensa discussão sobre a necessidade de se desenvolverem novos regulamentos para o uso da tecnologia GM. Ficou provado também que existem certos testes disponíveis que permitem avaliar e prevenir a colocação de um produto no mercado potencialmente perigoso para os consumidores (Clive, 2005).

A soja Roundup Ready<sup>®</sup> não tem nenhum alergénio novo adicionado, mas mantém os que já ocorriam naturalmente nesta planta. Contudo, pessoas alérgicas à soja devem evitar o consumo de qualquer produto derivado da soja, seja ele proveniente ou não de plantas GM. Actualmente, alguns cientistas já conseguiram desactivar o gene que expressa a proteína chamada de *Gly m Bd 30K/P34*, responsável por cerca de 65% das reacções alérgicas em indivíduos sensíveis à soja (Biotech, 2003).

Por outro lado, foram publicados estudos que defendem que os níveis de um alergénio conhecido na soja (o inibidor da tripsina) são 27% mais elevados na soja GM crua quando comparada com a soja convencional (Padgett et al., 1996). Estes dados parecem sugerir que o consumo de soja GM induz maior risco de aparecimento de reacções alérgicas do que as linhas convencionais.

Por todas as razões apresentadas, torna-se fundamental o desenvolvimento de novas e melhoradas técnicas que permitam a detecção de fragmentos de ADN nos mais variados tipos de alimentos.

### **2.1.3. Legislação sobre OGM**

Na última década, tem vindo a aumentar a apreensão da sociedade em geral sobre o uso da engenharia genética para a produção de géneros alimentícios e alimentos para animais. Se por um lado, se tem verificado uma crescente utilização dos OGM na produção de alimentos, por outro lado, têm também aumentado as campanhas lideradas por organizações ecologistas contra as culturas de organismos geneticamente modificados.

Segundo as empresas de biotecnologia e parte da comunidade científica, os OGM incluem diversas vantagens por assegurarem benefícios tanto para os agricultores como para a indústria alimentar, associados à falta de evidências científicas que comprovem a existência de efeitos negativos para a saúde humana. No entanto, a pressão exercida pelas associações ecologistas relativa aos possíveis riscos das culturas OGM na saúde humana e no ambiente tem vindo a crescer, opondo-se às vantagens apresentadas. Neste sentido, a UE e muitos outros países têm criado e implementado legislação específica de OGM regulamentando o uso, a libertação e a comercialização de OGM, com vista a proteger a saúde pública e o ambiente, assegurando assim o livre movimento de produtos GM dentro do espaço da União Europeia (Directiva 2001/18/CE).

Devido à presença de ingredientes derivados de OGM em alimentos comercializados, tem surgido um número crescente de regulamentos Europeus. De acordo com o Regulamento (CE) 1829/2003, os géneros alimentícios e os alimentos para animais geneticamente modificados só deverão ser colocados no mercado após uma avaliação científica dos potenciais riscos que possam estar presentes, tanto para a saúde humana e animal, como para o ambiente.

Os alimentos contendo, consistindo em, ou produzidos a partir de OGM que antes eram autorizados em conformidade com o Regulamento (CE) 258/97 relativo aos novos alimentos e novos ingredientes, são presentemente, autorizados pelo Regulamento (CE) 1829/2003. Este regulamento torna obrigatória a rotulagem da presença accidental ou tecnicamente inevitável de OGM na proporção acima de 0,9%. Considera necessário garantir a informação completa e fiável dos consumidores no que respeita aos OGM, aos produtos, géneros alimentícios e alimentos para animais

produzidos a partir de OGM, com forma a permitir uma opção esclarecida. A par do referido regulamento surgiu o Regulamento (CE) 1830/2003 que estabelece regras de rastreabilidade para os géneros alimentícios e para os alimentos para animais produzidos a partir de OGM, a fim de facilitar a rotulagem exacta desses produtos nos termos do Regulamento (CE) 1829/2003.

Segundo a actual legislação da UE que delibera que a avaliação científica dos alimentos derivados de OGM seja efectuada pelo painel específico sobre OGM da Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar, e estabelece (Mafrá et al., 2005):

- ◆ a obrigatoriedade dos processadores colocarem no mercado apenas produtos derivados de/ou contendo ingredientes GM autorizados;
- ◆ a rotulagem dos produtos conforme, ou seja, se o alimento é ou contém um OGM;
- ◆ a rotulagem ser obrigatória para produtos que são derivados ou contêm um OGM;
- ◆ o limite de 0,9% para a rotulagem de produtos contendo material GM aprovado na UE;
- ◆ o limite de 0,5% para a rotulagem de produtos contendo material GM cuja avaliação pela UE tenha sido positiva, apesar de não estarem aprovados;
- ◆ a rejeição de qualquer material GM não aprovado ou (ainda) não avaliado positivamente pela UE (tolerância de 0%);
- ◆ a rotulagem de produtos derivados de OGM, mesmo se o ADN ou a proteína não forem detectáveis (por exemplo, óleo de soja refinado);
- ◆ a obrigatoriedade de rastrear individualmente OGM contidos em géneros alimentícios ou alimentos para animais;
- ◆ e a isenção de rastrear a contaminação adventícia, tecnicamente inevitável, se as condições para a autorização do material GM forem cumpridas.

A urgência no controlo dos níveis de OGM presentes nos alimentos criou novas exigências quanto a testes analíticos para a análise destes produtos, não apenas em países onde a rotulagem de OGM é obrigatória, devido à legislação vigente, mas também naqueles que querem exportar para países com restrições. Os produtos GM apresentam, pelo menos, uma característica suplementar expressa pela introdução de um ou mais genes, que expressam geralmente uma ou mais proteínas adicionais, conferindo as propriedades de interesse. Alimentos crus como os cereais e os produtos processados destinados ao consumo humano, sendo derivados de culturas GM podem ser identificados pela detecção de ADN introduzido ou pela detecção de

novas proteínas codificadas pela expressão do material genético (Mafra e Oliveira, 2005).

## **2.2. Técnicas de detecção e quantificação de OGM**

As técnicas usadas para identificar e quantificar OGM em alimentos baseiam-se, geralmente, em dois tipos de moléculas: as proteínas e o ADN. Ambos os métodos são vastamente utilizados consoante a matriz a estudar.

### **2.2.1. Técnicas de detecção de Proteínas**

Actualmente, são diversas as técnicas baseadas na análise de proteínas que, tanto por métodos químicos como por métodos imunológicos permitem a detecção e quantificação de proteínas expressas por OGM, em alimentos. Das técnicas químicas destacam-se: a cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa, a cromatografia líquida de elevada eficiência, a espectroscopia de infravermelho próximo ou electroforese capilar (Ahmed, 2002; Elenis et al., 2008). Para além da análise de proteínas, as técnicas cromatográficas podem ser utilizadas na determinação do perfil químico e detecção de produtos decorrentes de modificações genéticas.

As proteínas expressas por um determinado OGM são geralmente detectadas por ensaios ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) baseados no reconhecimento específico de proteínas por anticorpos. Estas técnicas têm sido amplamente utilizadas na análise de alimentos crus. No entanto, a sua eficiência é largamente afectada pelos níveis de expressão do transgénico, que dependem do estado fisiológico da planta e do tecido específico analisado (Mafra e Oliveira, 2005).

Os ensaios imunológicos com anticorpos são ideais para a detecção qualitativa e quantitativa de vários tipos de proteínas em matrizes complexas quando o analito alvo é conhecido (Bret et al., 1999). Dos mais utilizados, destacam-se, para além dos ensaios ELISA, os ensaios de tiras de fluxo lateral que são uma variante do ensaio ELISA (Stave, 2002) e os ensaios de *Western Blot*. Em qualquer dos casos, o nível de expressão das proteínas transgénicas nos OGM constitui um factor limitante para o uso destes métodos. Contudo, segundo a bibliografia, as proteínas transgénicas estão dentro do limite de detecção destes ensaios imunológicos (Stave, 1999).



Os métodos baseados nas proteínas são, em geral, de execução rápida e fácil, bem como de baixo custo, no entanto, podem-se revelar pouco eficazes na análise de amostras de alimentos muito processados.

### **2.2.2. Técnicas de detecção de ADN**

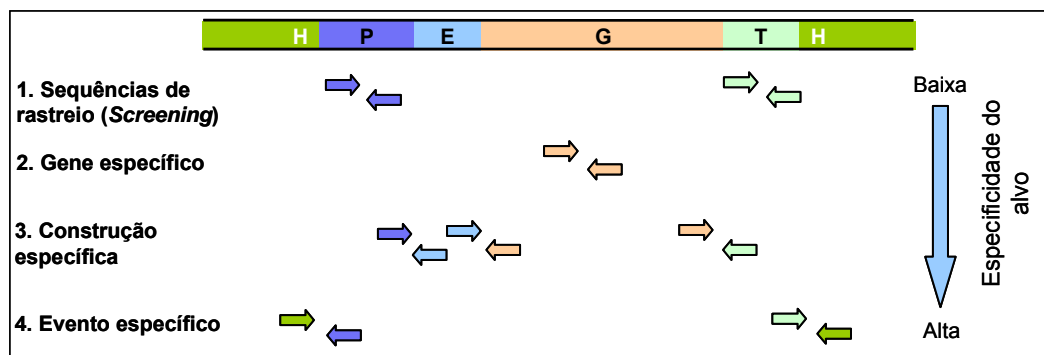
O ADN é uma molécula extremamente resistente a elevadas temperaturas, sofrendo pouca degradação com o calor, ao contrario do que acontece com as proteínas. A maior estabilidade térmica das moléculas de ADN e o facto de estarem presente na maioria dos tecidos biológicos faz com que sejam as moléculas eleitas para análise de OGM. Os métodos que se apoiam na sua análise revelam-se mais fiáveis, sendo ferramentas imprescindíveis não só para a investigação como também para as análises de rotina.

No entanto, antes de se proceder a qualquer tipo de análise, existem alguns procedimentos relativamente à quantidade de amostra e respectiva amostragem que devem ser seguidos, de forma a evitar problemas resultantes da falta de homogeneidade da mesma. Um plano de amostragem deve ser elaborado, visando assegurar um conjunto de amostras estatisticamente representativas do objecto de estudo. Na elaboração do plano de amostragem deve estar previsto um conjunto de parâmetros, tais como, a natureza da matriz a analisar (alimentos crus, ingredientes derivados ou produtos processados), o limite da toma, o custo da análise, a rapidez nos resultados e o risco aceitável para os intervenientes na transacção comercial (Mafra e oliveira, 2005).

A extracção e a purificação dos ácidos nucleicos constituem os primeiros passos de qualquer estudo de biologia molecular e de todas as técnicas de análise de ADN. O objectivo dos métodos de extracção dos ácidos nucleicos consiste na obtenção de ADN de qualidade e quantidade suficiente para amplificação por PCR.

Actualmente, existe uma enorme diversidade de métodos de extracção e purificação de ADN, pelo que a escolha de uma técnica adequada deve ter em conta alguns critérios: o ADN alvo, o organismo hospedeiro, a matriz (tecido, folhas, sementes, alimentos processados), os resultados desejados (pureza, quantidade) e a aplicação a que se destinam (PCR, PCR em tempo real, *immunoblotting*). De entre as técnicas de extracção de ADN de matrizes alimentares mais utilizadas podem-se referir os métodos CTAB e Wizard, e os kits comerciais, como o Nucleospin® food kit (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha) (Mafra et al., 2008a).

Um OGM inclui uma construção típica (*gene construct*) composta, pelo menos, por três elementos: o promotor – que funciona como “interruptor” para a leitura do gene inserido /alterado; o gene que foi inserido/alterado – que codifica a característica específica, e o terminador – que funciona como sinal para terminar a leitura do gene inserido/alterado (Mafra e Oliveira, 2005). No entanto, da inserção podem constar outros elementos, que geralmente visam a estabilidade e controlo do gene, a demonstração da inserção do gene no OGM ou o auxílio na combinação entre os vários elementos presentes na construção (Miraglia et al., 2004). Sabendo as sequências típicas numa construção de OGM, os métodos de PCR podem dividir-se em 4 categorias. A categoria 1 destina-se apenas ao rastreio de possíveis sequências de ADN GM; a categoria 2 compreende a detecção do gene alvo; a categoria 3 destina-se à detecção de construção específica (junções específicas entre os elementos da construção como entre o promotor e o gene de interesse); e a categoria 4 que compreende a detecção do evento específico (junção entre o genoma receptor e o ADN inserido que é única em cada evento). Estas categorias têm grau de especificidade crescente, sendo a categoria 4 a mais específica. A Figura 15 constitui um exemplo da construção de um OGM e dos quatro tipos de sequências alvo para PCR que mostram a especificidade crescente.



**Figura 15** – Representação esquemática de uma inserção típica e quatro tipos de ensaios baseados em PCR que mostram a especificidade crescente. H – ADN genómico do hospedeiro, P – elemento promotor, E – elemento melhorador, G – gene de interesse, T – elemento terminador (adaptado de Holst Jensen et al., 2003).

### 2.2.2.1. PCR Qualitativa

A análise de ADN consiste essencialmente na sua amplificação através da reacção em cadeia da polimerase (PCR). Esta técnica permite a amplificação, em milhões de vezes, de um fragmento específico de ADN moldado por dois

oligonucleótidos iniciadores (*primers*) desenhados para hibridarem em zonas opostas de cada uma das cadeias da sequência alvo em apenas poucas horas.

A técnica de PCR baseia-se numa repetição de ciclos com três temperaturas diferentes, nos quais o número de sequências alvo cresce de forma exponencial, atendendo ao número de ciclos predefinidos. Cada ciclo compreende três passos distintos: a desnaturação que permite a separação das cadeias das sequências alvo por aquecimento a cerca de 95°C; a hibridação que corresponde à ligação dos *primers* às cadeias desnaturadas a uma temperatura que varia entre 45-65°C) e a extensão que possibilita a síntese das cadeias complementares a partir dos *primers* hibridados por meio de uma polimerase da *Taq* (enzima obtida da polimerase do ADN da bactéria *Thermus aquaticus*) à temperatura de 72°C (Mafra e Oliveira, 2005). Este conjunto de três etapas de temperaturas distintas, designado por amplificação, é repetido entre 25 e 40 vezes, de acordo com a quantidade de ADN inicial. A verificação da presença e tamanho dos fragmentos de ADN é efectuada, geralmente, por electroforese em gel de agarose. Numa análise de PCR, cada sequência alvo deve ser previamente conhecida, para que os *primers* possam ser desenhados especificamente para o ADN em análise. A especificidade da técnica de PCR é conferida pelos *primers* escolhidos. Para a detecção da soja pode-se usar como controlo endógeno ou gene de referência o gene da lectina (Meyer e Jaccaud, 1997; Vollenhofer et al., 1999). Em cada análise devem constar: o fragmento de ADN alvo, os *primers* específicos, as bases de nucleótidos para a síntese do ADN (dNTP), a *Taq* polimerase e o seu cofactor ( $Mg^{2+}$ ). A PCR qualitativa envolve várias técnicas diferentes, nomeadamente, a PCR *nested* e a PCR *multiplex*.

A PCR *nested* compreende duas amplificações por PCR sequenciais que aumentam a quantidade da sequência de ADN amplificado, uma vez que este processo envolve o uso de dois conjuntos de *primers*, sendo o primeiro par usado na amplificação da região de interesse, e o segundo par na amplificação do fragmento de ADN amplificado pelo primeiro par de *primers*. Esta PCR é muito específica mas também mais propensa a possíveis contaminações. Esta técnica tem estado associada ao rastreio de ADN geneticamente modificado em óleos de sementes oleaginosas, nomeadamente em óleo de soja e óleo de colza GM com resultados bastante positivos (Hellebrand et al., 1998).

A PCR *multiplex* é outra das variantes da técnica de PCR. Nesta técnica ocorre a amplificação simultânea de duas ou mais sequências alvo através da utilização, na mesma reacção, de dois ou mais pares de *primers*. É uma técnica que tem vindo a ser usada na detecção de ADN de diferentes linhagens de milho GM, de colza GM, de soja RR, entre outras. Recentemente, a PCR em *multiplex*, tem também sido usada na

detecção de ADN em amostras de azeite, recorrendo ao uso de *primers* diferentes e ajustados à sequência a detectar (Pasqualone et al., 2007).

#### **2.2.2.2. PCR Quantitativa**

Um aspecto crucial na análise de alimentos contendo OGM é a sua quantificação, a qual é essencial por questões legislativas (Regulamento (CE) 1829/2003). Dependendo da sua concentração final no alimento, este será ou não rotulado como alimento contendo OGM. Para ultrapassar estes problemas desenvolveram-se dois tipos de técnicas baseadas na PCR: a PCR quantitativa competitiva (QC-PCR) e a PCR em tempo real (Mafra e Oliveira, 2005).

A QC-PCR foi das primeiras técnicas quantitativas baseadas na PCR a ser aplicada na análise de OGM. Esta técnica baseia-se na co-ampliação do ADN alvo e de uma sequência que funciona como padrão interno, designado como competidor, na mesma reacção e com o mesmo par de *primers*. Dado que a quantidade de competidor é conhecida, e visto que as eficiências da amplificação do gene alvo e do competidor são semelhantes, as quantidades dos dois produtos de PCR determinadas por electroforese em gel de agarose é proporcional à quantidade de ADN alvo e competidor presentes no início da amplificação. O competidor é uma molécula de ADN que, geralmente, é obtida por clonagem, de concentração conhecida e com a mesma sequência do ADN alvo, à excepção da deleção ou adição de 20-25 pb numa região do ADN que não envolve ligação com *primers*.

Este método comporta 4 etapas: a co-amplificação do ADN alvo e do padrão interno na mesma reacção; a separação dos produtos por electroforese em gel de agarose e a coloração com brometo de etídio; a determinação da intensidade de fluorescência das bandas por utilização de software específico; e a determinação da quantidade do ADN alvo através de uma curva padrão previamente preparada com materiais de referência. Para evitar resultados falseados nesta e noutras técnicas quantitativas de PCR, devem ser utilizados materiais de referência certificados por uma instituição reconhecida tal como o IRMM (Institute of Reference Methods and Materials, Geel, Bélgica). Contudo, este método tem algumas desvantagens, como o facto de haver necessidade de se construir e caracterizar um competidor diferente para cada ADN alvo a quantificar, e de este método ser apenas semi-quantitativo, pelo que os resultados obtidos só fornecem uma indicação da quantidade, por comparação com uma concentração padrão.

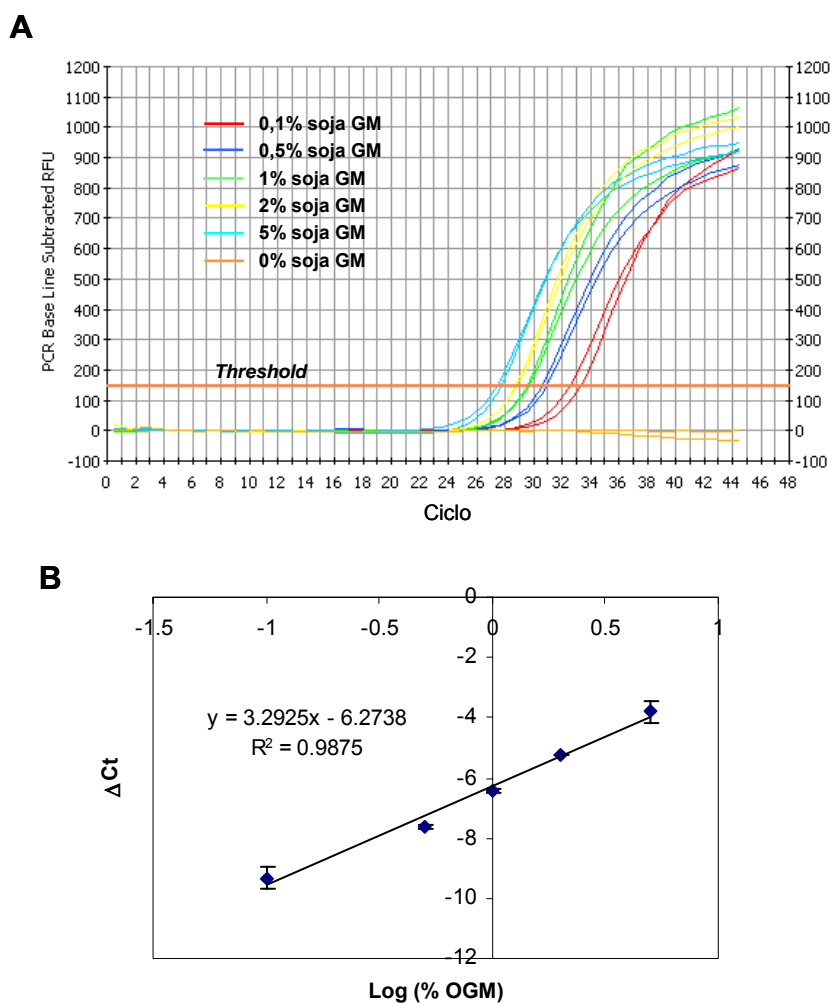
A PCR em tempo real é provavelmente a técnica mais utilizada para resolver os problemas de quantificação associados à PCR convencional. Em contraste com outras metodologias, os sistemas de PCR em tempo real monitorizam a reacção ao longo de cada ciclo. Neste tipo de sistema, a amplificação por PCR está acoplada a um sistema de emissão de um sinal fluorescente directamente proporcional à quantidade de produto obtido no final de cada ciclo. Através do registo da emissão fluorescente, ao longo de cada ciclo, é possível monitorizar a PCR durante a fase exponencial. Este facto deve-se ao uso de marcadores fluorescentes que funcionam como agentes corantes que se intercalam nas cadeias duplas do ADN, ou à utilização de sondas específicas para as sequências alvo marcadas com fluorescência. A técnica de PCR em tempo real baseia-se na monitorização e quantificação constante dos aumentos de fluorescência gerados durante a amplificação.

O número de ciclos de PCR necessários para a produção de um sinal de fluorescência estatisticamente acima do nível de ruído designa-se por  $C_t$  (*cycle threshold*). Desde que a eficiência da PCR seja constante, o número  $C_t$  é inversamente proporcional ao logaritmo da quantidade de ADN alvo no início da reacção, o que permite a produção de curvas padrão, a partir das quais se poderá quantificar uma determinada amostra (Figura 16) (Mafra e Oliveira, 2005). A especificidade da técnica de PCR em tempo real depende dos reagentes, da monitorização da reacção de amplificação e da instrumentação responsável pela monitorização do sinal emitido (Weighardt, 2006).

A análise por PCR em tempo real permitiu a substituição de um corante muito usado em biologia molecular, o brometo de etídio, por outros muito menos tóxicos, mais específicos e sensíveis como é o exemplo do corante SYBR Green I, que funciona como agente intercalar da hélice dupla de ADN. Além disso, este método permite o cálculo de temperatura de *melting* ( $T_m$ ) do fragmento alvo pelo seu tamanho e a sua diferenciação de outros segmentos de ADN de cadeia dupla, como por exemplo os dímeros de *primers*, que também emitem fluorescência mas com uma  $T_m$  inferior. Vários outros reagentes têm sido desenvolvidos para otimizar esta técnica, sendo o caso de sondas específicas e *primers* marcados com corantes fluorescentes. Podem usar-se vários formatos de sondas para estimar a quantidade de produto formado: sondas de hidrólise (TaqMan™), sondas de hidridação ou sondas FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) e sondas de interacção específica (Molecular Beacons™ e Scorpions™) (Mafra e Oliveira, 2005).

Esta técnica apresenta inúmeras vantagens: o facto de reduzir o tempo de reacção de 2-3h para 20-60 min; de não necessitar de recorrer a análise em gel de electroforese, diminuindo ainda mais o tempo de análise; e anular os problemas

associados ao uso de gel de agarose. A técnica de PCR em tempo real, pelas suas características, tornou-se largamente aplicável a matrizes complexas, incluindo os alimentos crus e os processados. O elevado custo relacionado principalmente com as sondas específicas e com o equipamento torna, no entanto, este método bastante dispendioso, pelo que o seu uso é ainda limitado.



**Figura 16** – Amplificação do gene RR da soja por PCR em tempo real. (A) representa a acumulação do fragmento alvo por medição da fluorescência (RFU) em cada ciclo de amplificação; (B) representa a regressão linear da relação entre a proporção (percentagem de OGM relativamente ao mesmo não-OGM) logarítmica de OGM e o valor Ct (*cycle threshold*).

De modo semelhante à técnica de QC-PCR, a PCR em tempo real, quando aplicada na detecção de OGM, usa como controlo interno uma sequência específica da espécie em causa. Assim, a concentração de um dado OGM é relativa à quantidade de ADN amplificável da espécie da planta e é expressa como percentagem de OGM em massa (Weighardt, 2006; Wurz et al., 1999).

Um dos métodos recomendados pela ISO 21570 (2005) é específico para a amplificação e detecção do gene característico da soja (gene da lectina, *le1*) e do ADN originado pela construção específica do gene presente na linha da soja geneticamente modificada GTS-40-3-2 (Roundup Ready®). Esta técnica baseia-se na tecnologia TaqMan devido ao uso de sondas de hidrólise do tipo TaqMan™. De referir que esta técnica de PCR em tempo real foi aplicada com sucesso na amplificação do gene de referência para a soja obtido a partir de extractos de ADN de óleo de soja (Gryson et al., 2004). No entanto, nesse mesmo estudo, a referência à baixa quantidade de ADN justifica a ausência de amplificação da soja RR.

### **2.2.3. Aplicação da PCR na detecção de ADN em óleos vegetais**

Actualmente, existe uma enorme diversidade de produtos GM disponíveis para os consumidores, pelo que constituem fonte de estudo por parte da comunidade científica. Dado a vasta variedade de matrizes existentes, que vão desde produtos crus a produtos altamente processados, têm sido desenvolvidos muitos métodos com a finalidade de rastrear e quantificar a presença de OGM (Tabela 11). Estes métodos baseiam-se na sua maioria na PCR, pelo que esta técnica constitui uma valiosa ferramenta na detecção e rastreabilidade de material transgénico, uma vez que permite a sua detecção de forma rápida e a baixo custo.

A detecção e quantificação de ADN em alimentos processados como biscoitos, pão, farinhas, tem sido vastamente estudada, tendo-se obtido resultados muito positivos aquando da aplicação de técnicas de PCR qualitativa e quantitativa para amplificação de ADN dos extractos obtidos a partir destas matrizes sólidas (Mafra et al., 2008a). No entanto, em matrizes processadas, como os azeites e óleos vegetais, a obtenção de ADN amplificável é muito difícil, sendo os extractos obtidos, na maioria das vezes, de fraca qualidade ou sem ADN amplificável.

Contudo, estudos recentes focados na obtenção de ADN a partir de matrizes lipídicas têm realçado alguns progressos. Nos azeites foram obtidas quantidades significativas de ADN em amostras obtidas por prensagem a frio (Consolandi et al., 2008), sendo possível a aplicação de diversas técnicas para a amplificação do ADN dos fragmentos obtidos. Estas técnicas incluem: análise de polimorfismos do ADN amplificados aleatoriamente (RAPD, *Random Amplified Polymorphism DNA*) (Busconi et al., 2003), análise de polimorfismos no comprimento dos fragmentos amplificados (AFLP, *Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Pafundo et al., 2005), análise

microsatélites (Pasqualone et al., 2007), e análise por PCR multiplex (Consolandi et al., 2008). Pasqualone e colaboradores (2007) demonstraram a presença de ADN amplificável em extractos obtidos a partir de 50 mL de azeites não filtrados e em 200 mL de azeites filtrados, sendo os fragmentos de ADN de azeites não filtrados de maior tamanho e melhor qualidade. No entanto, a extracção dos fragmentos de ADN a partir de azeites filtrados pode ser facilmente optimizada partindo de uma maior quantidade de azeite filtrado e de um maior volume de reagentes de extracção (Pasqualone et al., 2007).

**Tabela 11 – Métodos utilizados na detecção de OGM.**

<b>Técnica Analítica</b>	<b>Gene Alvo</b>	<b>Limite de detecção</b>	<b>Referência</b>
PCR multiplex	Bt11, Mon810, T25 e GA21	0,05%	Hernández et al., 2005
PCR <i>Multiplex</i> – Electroforese capilar em géis com detecção de fluorescência por laser	Bt11, Mon810, T25, GA21 e Bt176	0,05%	García-Cañas, et al; 2004
Electroforese capilar por sensor e detecção de fluorescência por laser	Sequências terminador NOS, promotor 35S e gene da lectina (gene referência da soja)	0,1%	Obeid et al., 2004
PCR Multiplex – Electroforese capilar em géis com detecção de fluorescência por laser	Bt11, GA21, MON810, e NK603	0,1%	Kalogianni et al., 2006
PCR – com método de hibridação bioluminométrica	Sequências terminador NOS, promotor 35S e gene da lectina (gene referência da soja)	0,05%	Glynou et al., 2004
Biossensor de ADN baseado em nanopartículas	Sequências terminador NOS e promotor 35S	0,1%	Nadal et al., 2006
PCR <i>Multiplex</i> acoplado com microarray de nucleótidos	Promotor 35S, terminador 35S, promotor NOS, terminador NOS, promotor FMV35S, terminador NptII	0,5% (Soja); 0,1% (Milho)	Xu et al., 2006
PCR <i>Multiplex</i> com microarray	Milho Bt176, Bt11, GA21, MON810, CBH351 e T25, Colza Topas 19/2 e T45, e Soja Roundup Ready®	<0,3%	Leimanis et al., 2006
PCR <i>Multiplex</i>	Proteína insecticida vegetal (Vip) 3A	0,1%	Singh et al., 2008

Pasqualone e colaboradores demonstraram a presença de ADN amplificável em extractos obtidos a partir de 50 mL de azeites não filtrados e em 200 mL de azeites filtrados, sendo os fragmentos de ADN de azeites não filtrados de maior tamanho e melhor qualidade. No entanto, a extracção dos fragmentos de ADN a partir de azeites



filtrados pode ser facilmente otimizada partindo de uma maior quantidade de azeite filtrado e de um maior volume de reagentes de extracção (Pasqualone et al., 2007).

Para a extracção de ADN de azeites pode recorrer-se a variados métodos, já sobejamente conhecidos, entre eles os métodos clássicos baseados no reagente CTAB (Doyle e Doyle, 1987) e no hexano (Consolandi et al., 2008), e os métodos comerciais: DNeasy Plant mini kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), NucleoSpin® Plant e NucleoSpin® Food kit (Macherey Nagel, Duren, Alemanha), Wizard® Magnetic DNA purification system for food (Promega, Leiden, Holanda), e Gene Elute Plant kit (Sigma, St. Louis, MO, EUA).

Desta forma, recorrendo-se a bases de dados genómicas relativas às culturas de azeites, torna-se possível a identificação das diferentes cultivares existentes num dado azeite. Todos estes estudos permitem dar um óptimo contributo para os problemas relacionados com a rastreabilidade e autenticidade destes produtos decorrentes do elevado valor comercial do azeite.

No que respeita aos óleos vegetais, a detecção de ADN torna-se ainda mais difícil devido aos processos químicos e físicos que ocorrem durante a refinação, nomeadamente as alterações no pH, os tratamentos a elevadas temperaturas, a actividade das nucleases em algumas das etapas que podem danificar o ADN genómico (Gryson et al., 2002).

Hellebrand e seus colaboradores (1998) também evidenciaram a presença de ADN amplificável em extractos de óleo de colza refinado, partindo de um volume inicial de 200 mL de óleos comerciais. De óleos refinados e não refinados obtêm-se fragmentos de ADN amplificáveis, evidenciando a possibilidade de rastreio de ADN GM bem como o rastreio de prováveis adulterações em óleos alimentares com base na técnica de PCR (Hellebrand et al., 1998).

Doveri e Lee (2007), demonstraram ser possível a extracção de ADN amplificável a partir de amostras de óleos comerciais 100% vegetais de colza, girassol e milho pelos métodos Wizard® Magnetic for Food (Promega) e Gene Clean III kit (MP, Biomedicals) de acordo com as alterações descritas. Contudo, neste estudo, não há referência ao volume inicial de óleo usado na extracção do ADN. Segundo estes investigadores, é possível a detecção de ADN a partir de óleos vegetais, recorrendo à utilização de *primers* que amplificam uma sequência do ADN 5S, por técnicas de PCR qualitativa e PCR em tempo real. Estes dados parecem dar um novo contributo para as análises de avaliação de adulterações de óleos de maior valor comercial, uma vez que, permitem a detecção de misturas com óleos mais baratos (Doveri e Lee, 2007).

Os óleos de soja são também fonte de estudo devido à sua importância no panorama da alimentação mundial, dado que representam cerca de 30% do consumo

geral de óleos vegetais (Figura 1, secção 1.1.2). No entanto, pouco tem sido publicado nos últimos tempos, a respeito da detecção de ADN a partir de óleos de soja.

Num dos estudos realizados, Pauli e os seus colaboradores (1998) extraíram ADN amplificável a partir 300 µL de sedimento centrifugado de óleo de soja não refinado (óleo cru) por técnicas de PCR *nested*. O ADN foi extraído recorrendo ao método Wizard de acordo com o descrito no referido estudo, contudo, não há referência ao volume inicial de óleo de soja não refinado utilizado na referida centrifugação.

Outro estudo, refere a extracção de ADN de amostras de óleo de soja cru e desgomado, quando utilizadas grandes quantidades de óleo ( $\geq 250$  g), sendo o ADN amplificável por PCR qualitativa e PCR em tempo real (Gryson et al., 2004). Segundo estes investigadores, o ADN é na sua maioria retido nas gomas, sendo eliminado da linha de produção, através das centrifugações realizadas durante a desgomagem (Gryson et al., 2002).

A literatura demonstra ainda que, é detectável a presença de ADN extraído pelo método Wizard<sup>®</sup> Magnetic Purification System for Food kit (Promega) a partir de 5 mL de óleo de soja cru e da mesma quantidade de óleo desgomado (Bogani et al., 2009). A amplificação é detectada por técnicas de PCR qualitativa e de PCR de amplificação de um gene específico.

Estes dados evidenciam assim que ainda há muito a fazer quanto à detecção de ADN específico da espécie ou geneticamente modificado nos óleos vegetais. Matrizes lipídicas como os óleos vegetais, revelam ser bastante problemáticas no que respeita à extracção de ADN amplificável. Há ainda a ter em conta, os processos distintos de refinação a que diferentes óleos vegetais são sujeitos (refinação física, química ou uma combinação das duas), e os diferentes tipos de processos industriais usados na sua produção. As mesmas etapas de refinação do óleo podem envolver condições diferentes de temperatura, pressão, entre outros, dependendo do tipo de matéria-prima e da região onde é produzido.

# PARTE EXPERIMENTAL

---

## **2.3. Descrição das Amostras**

### **2.3.1. Amostras obtidas ao longo da produção de óleo**

As amostras analisadas foram recolhidas ao longo das diferentes etapas da linha de produção do óleo de soja nas instalações da Sovena (Figura 5). As amostras dos grãos de soja (inteiro, partido, laminado, extrudido e farinha) correspondem às fases de preparação e extracção e as amostras de óleos (cru, neutralizado, lavado, branqueado e desodorizado) pertencem às etapas de extracção e refinação do óleo de soja.

Tal como já foi descrito no capítulo anterior, as amostras de grão foram submetidas a trituração por utilização de uma picadora Moulinex modelo 320. Esta operação foi realizada cuidadosamente de forma a minimizar possíveis contaminações entre as diferentes amostras, pelo que foram utilizados acessórios independentes e esterilizados quimicamente (solução de hipoclorito de sódio e spray de remoção de ADN – Zero DNA, Esterplas, S<sup>ta</sup> Maria da Feira, Portugal) para cada amostra. Cada amostra foi recolhida em recipientes esterilizados e armazenadas a -20°C até posterior análise.

Neste estudo, foram também utilizadas 4 amostras de grãos de soja previamente fornecidos pela mesma indústria e rotulados como não OGM, as quais se designaram neste trabalho como soja convencional. Dessas amostras, uma encontrava-se datada do ano 2000 e restantes do ano de 2006.

### **2.3.2. Amostras Comerciais**

Foram adquiridas 8 amostras de óleos comerciais de marcas diferentes disponíveis no mercado. Os óleos comerciais incluíram sete marcas de óleos alimentares (sendo um destes óleos de marca branca) e um óleo 100% soja (Figura 17).



**Figura 17** – Imagem dos óleos comerciais adquiridos no mercado.

### 2.3.3. Materiais de Referência

Para a optimização/validação das metodologias desenvolvidas para a detecção e quantificação de soja geneticamente modificada utilizaram-se materiais de referência certificados produzidos pelo Institute for Research Materials and Measurements (IRMM, Geel, Bélgica) e comercializados pela Fluka (Chemie GmbH, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha). Os materiais de referência incluíram 6 farinhas com 0%; 0,1%; 0,5%; 1%; 2% e 5% de soja geneticamente modificada contendo o evento GTS-40-3-2 (Roundup Ready®).

## 2.4. Cuidados gerais na aplicação das Técnicas de Biologia Molecular

A aplicação das técnicas de biologia molecular envolveu procedimentos bem definidos com o objectivo de controlar e evitar contaminações nos extractos e soluções utilizadas. Deste modo seguiram-se os seguintes princípios:

- ✓ As extracções das amostras e as reacções em PCR foram efectuadas em espaços físicos diferentes (salas diferentes), onde cada espaço continha o seu equipamento específico nomeadamente luvas, tubos e pontas esterilizados,

microcentrífuga, micropipetas e vórtex. A sala de preparação das reacções de PCR estava equipada com luz UV para esterilização. Além desta medida também foi utilizado um spray para remoção de ADN contaminante (Zero DNA, Esterplas, S<sup>ta</sup> Maria da Feira, Portugal).

- ✓ Os tubos de reacção e os tubos de PCR (rotulados com *DNAase/RNAase free*) foram esterilizados por autoclavagem a 121°C. As pontas com filtro foram adquiridas esterilizadas e *DNAase/RNAase free*.
- ✓ Todos os reagentes aquosos, com excepção dos *primers*, dNTP e ADN polimerases, foram também sujeitos a autoclavagem a 121°C de forma a degradar ADN e nucleases, evitando contaminações ou degradação de extractos.
- ✓ Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau de pureza apto ao uso em biologia molecular, sendo estas soluções e os reagentes, devidamente divididos em alíquotas pequenas, usados exclusivamente para PCR.
- ✓ Em cada reacção de PCR efectuou-se um controlo negativo, isento de ADN mas contendo todos os componentes da reacção excepto a amostra de ADN (Somma e Querci, 2006).

## **2.5. Metodologias de extracção de ADN**

### **2.5.1. Amostras provenientes de Grãos de Soja**

As amostras de grão de soja foram extraídas por dois procedimentos, o método CTAB (brometo de cetiltrimetilamónio) e o método Wizard, ambos baseados nos métodos propostos por Lipp e colaboradores (1999) e optimizados como o descrito por Mafra e colaboradores (2008a). Sendo ambas as técnicas aplicadas com sucesso na extracção do ADN do grão de soja, qualquer um dos métodos pode ser utilizado na extracção do ADN a partir desta matriz.

#### **2.5.1.1. Método Wizard**

O método Wizard (Figura 18) consistiu na utilização parcial do kit Wizard<sup>®</sup> Plus Minipreps (Promega, Madison, WI, EUA).

Cerca de 100 mg de cada amostra foram pesados para um tubo de reacção esterilizado de 2 mL. A esta quantidade de amostra foram adicionados: 860  $\mu$ L de tampão de extracção TNE (solução constituída por 10 mM de Tris, 150 mM de NaCl, 2 mM de EDTA e 1% de SDS), 100  $\mu$ L de solução de hidrocloreto de guanidina 5 M e 40  $\mu$ L de solução de proteinase K (20 mg/mL). Após agitação vigorosa por vórtex, a mistura foi colocada num banho a 60°C para incubar durante um período de 3h. Os tubos com a mistura sofreram agitação periódica, com o objectivo de otimizar a extracção do ADN. De seguida, os tubos com a mistura reaccional foram sujeitos a centrifugação a 18 514xg, a 4°C durante 15 minutos. Após centrifugação, retirou-se cerca de 700  $\mu$ L de sobrenadante para um novo tubo esterilizado, procedendo-se a uma nova centrifugação durante 5 minutos nas mesmas condições (18 514xg, a 4°C).



**Figura 18** – Imagens representativas do método de extracção por Wizard.

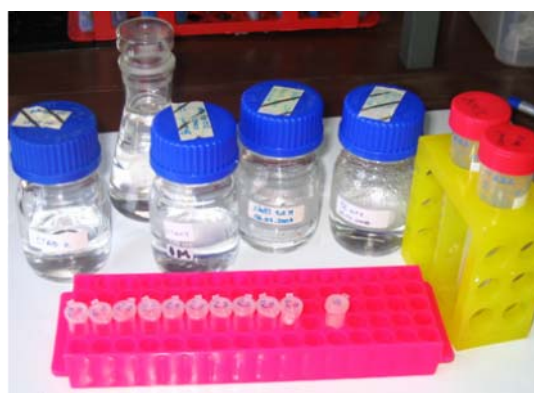
Depois desta segunda centrifugação, recolheram-se cerca de 600  $\mu$ L de sobrenadante para um novo tubo esterilizado de 2 mL, adicionando-se 1 mL de resina de purificação de ADN Wizard® (Promega, Madison, WI, EUA) e homogeneizou-se gentilmente por inversão. Numa das extremidades da coluna colocou-se uma seringa de 2 mL cujo êmbolo serviu para empurrar a mistura ao longo da coluna. Na outra extremidade colocou-se um tubo de 2 mL para onde foi recolhida a mistura. O ADN que ficou retido na resina da coluna foi lavado em seguida com 2 mL de isopropanol (80% v/v). Após uma nova centrifugação durante 2 minutos (a 10 000xg), procedeu-se à secagem das colunas à temperatura ambiente durante 5 minutos. A coluna foi transferida para novo tubo esterilizado de 1,5 mL. Para eluição do ADN retido na resina, adicionou-se 100  $\mu$ L de tampão TE 0,1x (10 mM de Tris, 1 mM de EDTA) previamente aquecido a 70°C. Deixou-se em contacto com a resina à temperatura

ambiente durante 1 minuto e centrifugou-se durante 1 minuto a 10 000xg, obtendo-se desta forma o extracto de ADN.

Cada etapa correspondente às amostras de grão de soja foi sujeita a extracções de ADN em duplicado.

### 2.5.1.2. Método CTAB

No método CTAB (Figura 19), pesaram-se cerca de 100 mg de cada amostra para um tubo de reacção estéril de 2 mL. Em cada tubo adicionaram-se 1000 µL de solução de extracção CTAB<sub>1</sub> (20 g/L de brometo de cetiltrimetilamónio, 1,4 mM de NaCl, 0,1 M de Tris-HCl e 20 mM de EDTA) e misturou-se com agitação vigorosa por vórtex. A mistura foi colocada a incubar num banho a 65°C, durante 1h com agitação periódica. Após incubação, a mistura foi centrifugada durante 15 minutos (18 514xg, a 4°C) retirando-se cerca de 700 µL de sobrenadante para um tubo estéril de 1,5 mL. O sobrenadante foi sujeito a nova centrifugação durante 5 minutos (18 514xg, a 4°C) e recolheram-se cerca de 600 µL do sobrenadante para um novo tubo de 1,5 mL. O sobrenadante foi extraído por adição de 500 µL de clorofórmio, misturando-se em vórtex durante cerca de 20 segundos. Em seguida efectuou-se uma nova centrifugação durante 10 minutos (12 000xg, a 4°C) transferindo-se a fase superior para um novo tubo estéril de 2 mL. A esta solução, adicionou-se o dobro do seu volume de solução de precipitação CTAB<sub>2</sub> (5g/L de brometo de cetiltrimetilamónio; 0,04 M de NaCl), homogeneizou-se e incubou-se à temperatura ambiente durante 1 hora.



**Figura 19** – Imagens representativas do método de extracção CTAB.

Após centrifugação durante 10 minutos (12 000xg, a 4°C), rejeitou-se o sobrenadante por inversão, dissolveu-se o precipitado em 350 µL de NaCl 1,2 M e adicionaram-se 350 µL de clorofórmio, agitando-se em vórtex durante 30 segundos. Procedeu-se à centrifugação desta mistura durante 10 minutos (12 000xg, a 4°C), recolhendo-se a fase superior. À fase superior recolhida juntaram-se 0,6 partes de isopropanol (a -20°C) e centrifugou-se durante 10 minutos (12 000xg, a 4°C). Por inversão, rejeitou-se novamente o sobrenadante, lavando cuidadosamente o precipitado com 500 µL de etanol (70% v/v) a -20°C. Depois de centrifugar durante 10 minutos (12 000xg, 4°C), retirou-se cuidadosamente o sobrenadante com uma micropipeta e colocou-se o precipitado a secar na estufa a 50°C durante cerca de 30 minutos.

Por fim, o precipitado obtido foi dissolvido em 100 µL de TE 0,1x (10 mM de Tris, 1 mM de EDTA), tem ficado durante a noite em agitação suave para promover uma boa hidratação do ADN do *pellet*.

As amostras de grão de soja correspondentes a cada etapa preparativa para a extracção do óleo foram sujeitas a extracções de ADN em duplicado.

## **2.5.2. Amostras de Óleos Vegetais**

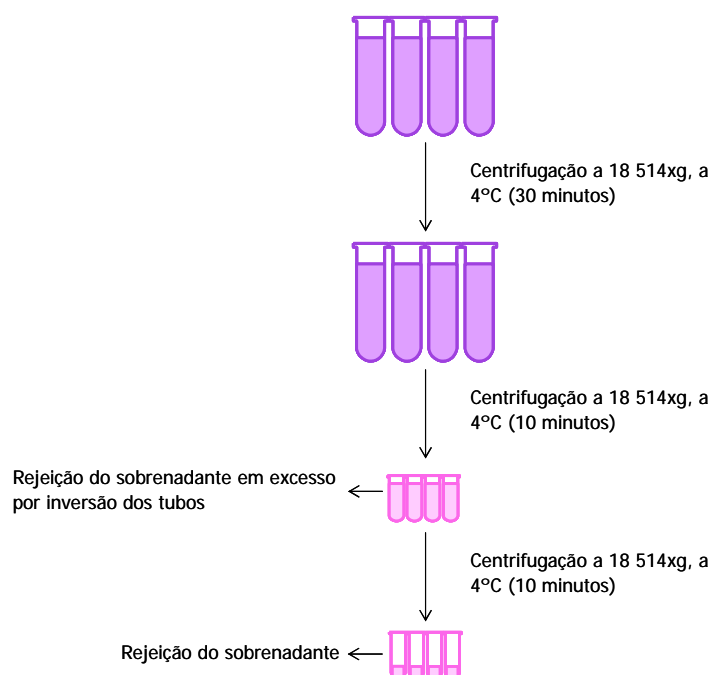
De forma a escolher o melhor método para a extracção de ADN em amostras de óleos obtidos nas diferentes fases da refinação e amostras comerciais) utilizaram-se 4 métodos de extracção: CTAB, Wizard; Nucleospin® food kit e o kit Wizard® Magnetic DNA purification system for food. Os três primeiros métodos foram já largamente aplicados na extracção do ADN das mais diversas matrizes e com sucesso comprovado (Mafra et al., 2008a). O método Wizard® Magnetic foi escolhido uma vez que está catalogado pelo fabricante como um método adequado para a extracção de ADN em amostras de óleo. Os métodos, Wizard® Magnetic e Nucleospin® food kit, foram usados de acordo com as instruções do fabricante, apenas com algumas ligeiras alterações.

Para o uso dos métodos: Wizard, CTAB e Nucleospin® food kit, todos os óleos sofreram centrifugação. Este passo de pré-concentração das amostras permitiu concentrar grande parte do ADN existente na quantidade inicial.

Pesaram-se cerca de 200 g de cada amostra de óleo para 4 tubos de centrífuga esterilizados de 80 mL. Cada amostra (dividida pelos 4 tubos) foi centrifugada durante cerca de 30 minutos (18 514xg, a 4°C). Após este período de centrifugação os tubos de óleo foram inspeccionados para verificação da existência de



resíduo no tubo. Quando necessário, este passo foi repetido, mas alterando-se o tempo da centrifugação para 10 minutos. De seguida os tubos foram vertidos cuidadosamente, e os resíduos recolhidos para tubos esterilizados de 2 mL (4 a 6 tubos). Estes tubos foram sujeitos a nova centrifugação nas mesmas condições (18 514xg, a 4°C) durante 10 minutos. A fase superior de óleo foi rejeitada de cada tubo e os resíduos obtidos seguiram para o passo de extracção de ADN (Figura 20).



**Figura 20** – Esquema relativo à pré-concentração das amostras de óleo.

### 2.5.2.1. Método Nucleospin® Food Kit

O método Nucleospin® food kit (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha) foi executado de acordo com as instruções do produtor, apenas com ligeiras alterações (Figura 21).

A cada um dos 4 tubos obtidos da pré-concentração de 200 g de óleo, adicionaram-se 550 µL de solução de lise CF pré-aquecida a 65°C e 10 µL de proteinase K (20 mg/mL). A mistura foi homogeneizada vigorosamente por vórtex e colocada a incubar durante 1 hora a 65°C, com agitação ocasional. Após o período de incubação, a mistura foi sujeita a centrifugação (18 514xg, a 4°C) durante 10 minutos. De seguida, recolheram-se 400-500 µL da fase aquosa para novo tubo estéril de 1,5

mL, o qual foi novamente centrifugado nas mesmas condições (18 514xg, a 4°C) durante 5 minutos. Após centrifugação, todo o sobrenadante (400-500 µL) foi transferido para um novo tubo estéril de 1,5 mL ao qual se adicionou o mesmo volume de solução de precipitação C4 e 0,6 partes do volume centrifugado em etanol. Misturou-se cuidadosamente por inversão e carregou-se a coluna de extracção com 750 µL de mistura. A coluna foi centrifugada a 13 000xg à temperatura ambiente durante 1 minuto. Este passo foi repetido até todo o volume dos 4 tubos terem passado pela coluna que retém o ADN. Após adsorção do ADN à coluna, esta foi lavada 3 vezes. Na primeira lavagem juntaram-se 400 µL de CQW à coluna e procedeu-se a uma centrifugação (13 000xg, à temperatura ambiente) durante 1 minuto. Esta lavagem com CQW foi repetida 2 vezes. Na segunda lavagem adicionaram-se à coluna 700 µL de etanol e centrifugou-se nas mesmas condições da primeira lavagem. Também este passo foi repetido 2 vezes. Por fim a terceira lavagem consistiu na adição de 400 µL de etanol seguida de nova centrifugação (13 000xg, à temperatura ambiente) durante 2 minutos.



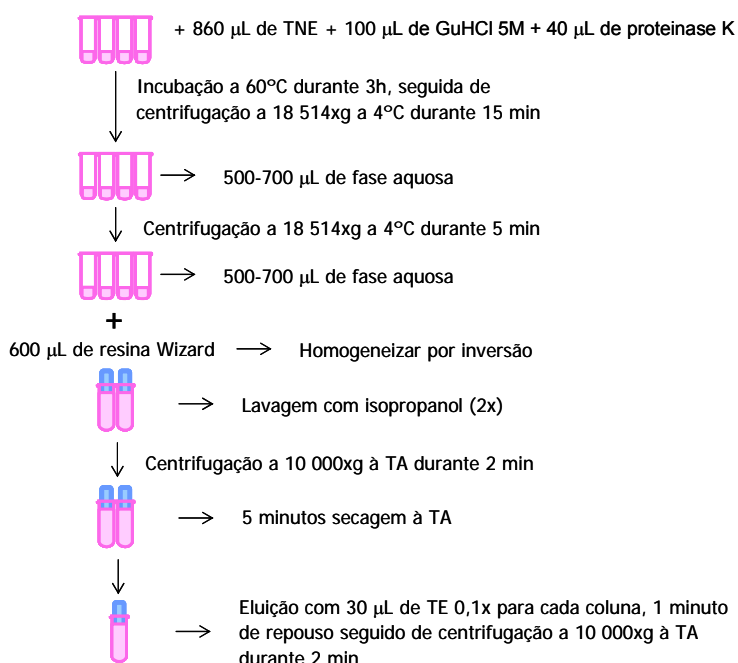
**Figura 21** – Imagem ilustrativa do método de extracção de ADN – Nucleospin® food kit.

O ADN foi eluído da coluna por adição de 50 µL de solução CE, previamente aquecida a 70°C. A solução esteve em contacto com o ADN durante 5 minutos, no final dos quais a coluna foi centrifugada a 13 000xg, à temperatura ambiente durante 1 minuto. O volume recolhido da centrifugação contém o ADN extraído das amostras. Todos os extractos foram armazenados a -20°C até posterior análise.

### 2.5.2.2. Método Wizard

O método Wizard descrito na secção 2.5.1.1, com ligeiras alterações, foi também utilizado na extracção de óleos. As alterações efectuadas envolveram os seguintes pontos: 600 µL de resina Wizard®, 2 lavagens com isopropanol e a eluição do ADN da coluna foi realizada com a adição de 30 µL de solução TE 0,1x (10 mM de Tris, 1 mM de EDTA) sendo o conteúdo das duas colunas, utilizadas em cada amostra, reunidas num único tubo estéril de 1,5 mL.

A Figura 22 resume os passos executados na extracção do ADN segundo o método Wizard adaptado para a extracção de ADN de amostras de óleos.



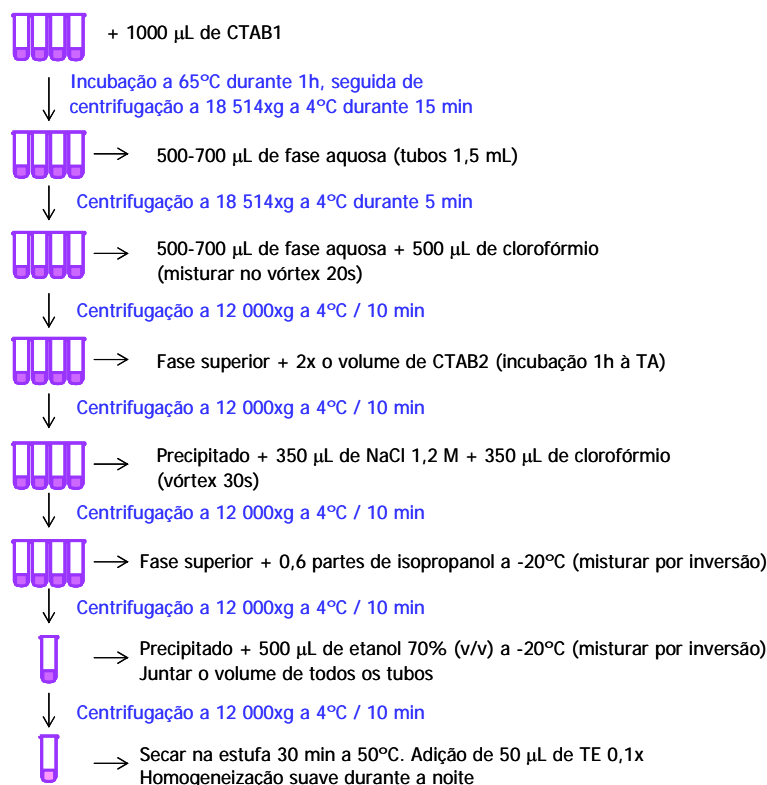
**Figura 22** – Esquema resumido do método Wizard usado na extracção de ADN de amostras de óleo.

### 2.5.2.3. Método CTAB

O método CTAB descrito na secção 2.5.1.2, com ligeiras alterações, foi também aplicado na extracção de amostras de óleos. Estas alterações envolveram os seguintes pontos: na fase de adição do etanol, o conteúdo dos 4 tubos foi reunido num único tubo e na etapa final, o precipitado obtido foi dissolvido em 50 µL de TE 0,1x (10

mM de Tris, 1 mM de EDTA), tendo ficado durante a noite em agitação suave de forma a otimizar a hidratação do extracto de ADN (Mafra et al., 2008a).

A Figura 23 resume os passos executados na extracção do ADN segundo o método CTAB adaptado para a extracção de ADN de amostras de óleos.



**Figura 23** – Esquema representativo da aplicação do método de CTAB à extracção de ADN em amostras de óleo.

#### 2.5.2.4. Método Wizard<sup>®</sup> Magnetic

O método Wizard<sup>®</sup> Magnetic DNA purification system for food (Promega, Madison, WI, EUA), foi a última técnica utilizada na extracção de ADN de amostras de óleos vegetais refinados, incluindo as amostras de óleos comerciais e das etapas de refinação do óleo de soja (Figura 24).

Para a aplicação deste método não se efectuou a fase de pré-concentração dos óleos, tendo-se seguido as instruções do produtor, apenas com ligeiras alterações. Uma das alterações consistiu na utilização de 200 g de óleo, em vez dos 160 g recomendados, numa tentativa de aumentar o rendimento e uniformizar a quantidade de amostra utilizada em todos os protocolos de extracção.



**Figura 24** – Reagentes usados no método de extracção de ADN por Wizard® Magnetic DNA purification system.

Pesaram-se para cada um de 5 tubos tipo *falcon* esterilizados de 50 mL, cerca de 40 g de amostra de óleo. A cada tubo adicionaram-se 2 mL de solução de lise A (*Lysis Buffer A*) agitando-se vigorosamente os tubos até a mistura ficar com um aspecto claro e opaco. De seguida, juntou-se 1 mL de solução de lise B (*Lysis Buffer B*) à mistura, agitando-se novamente de forma vigorosa. Após um período de espera de 10 minutos com agitação ocasional, adicionaram-se 3 mL de solução de precipitação (*Precipitation Solution*) à mistura agitando-se de forma enérgica durante 1 minuto. A mistura dispersou-se uniformemente, tendo algumas etapas de óleo apresentado uma cor esverdeada nesta fase do processo. Centrifugou-se a mistura (4000xg, a 4°C) durante 25 minutos e removeu-se a camada superior de óleo até se atingir a interface com a fase aquosa. Esta operação permitiu facilitar a aproximação à fase aquosa de modo a que esta não fosse contaminada pelo óleo. Pipetou-se toda a fase aquosa (coloração azul) para um novo tubo *falcon* de 50 mL. Todo o volume de fase aquosa proveniente de cada um dos 5 tubos *falcon* foi colectado para um tubo novo estéril. Seguiu-se uma nova centrifugação nas condições anteriores durante 10 minutos. Após centrifugação, transferiu-se todo o volume de fase aquosa para um novo tubo *falcon* de 50 mL, tendo o cuidado de limpar a ponta da micropipeta para evitar a transferência de gordura para o novo tubo. A este volume adicionaram-se 50 µL de Magnesil PMP's previamente homogeneizado. Agitou-se esta mistura brevemente no vórtex e adicionaram-se 0,9 partes do volume em isopropanol. Após nova agitação, a mistura foi deixada a repousar durante 1h à temperatura ambiente, com homogeneização ocasional. Durante este período de tempo o ADN presente na solução adere as partículas magnéticas. No final deste passo colocou-se o tubo no suporte PolyATtract® System 1000 Magnetic Separation Stand aguardando-se pelo menos 2 minutos até que as partículas magnéticas ficassem atraídas ao tubo pelo lado do suporte e a solução se apresentasse límpida. Ver-teu-se cuidadosamente o tubo

segurando firmemente o suporte. Depois de removida a solução, retirou-se o tubo do suporte e adicionaram-se cerca de 1,5 mL de etanol 70% (v/v) a -20°C às partículas magnéticas. As partículas lavadas com o etanol foram transferidas para um tubo de reacção estéril de 2 mL. Este tubo foi novamente colocado no suporte esperando-se cerca de 2 minutos para as partículas ficarem atraídas ao suporte magnético. Rejeitou-se a solução resultante da lavagem e repetiu-se o procedimento de lavagem com 1,5 mL de etanol 3 vezes. O tubo foi levado no suporte à estufa a 50°C durante cerca de 20 minutos, até secagem das partículas magnéticas. Adicionaram-se cerca de 50 µL de solução de TE 0,1x (10 mM de Tris, 1 mM de EDTA) aos magnetos e incubou-se a 65°C num banho durante 5 minutos. Após este período o tubo foi colocado no suporte magnético onde ficou a aguardar durante cerca de 1 minuto. Por fim, retirou-se todo o extracto de ADN por pipetagem para um novo tubo de reacção estéril de 1,5 mL, de forma a serem removidas as partículas magnéticas. Todos os extractos foram armazenados a -20°C até posterior análise.

## **2.6. Técnicas de análise de ADN extraído**

Nas amostras provenientes de grãos de soja (etapas preparativas e etapa pós-extracção), a concentração do ADN foi determinada a 260 nm e a pureza a 280 nm. As amostras foram também lidas a 320 nm como forma de identificar a presença de interferentes ou material estranho, na solução ou na própria cuvete. Para cuvetes de 1 cm de percurso óptico, a leitura de absorvância a 260 nm foi igual a 1 correspondeu aproximadamente a 50 µg/mL de ADN de cadeia dupla (Somma et al., 2006). As amostras foram lidas num espectrofotómetro Shimadzu UV-160A (Shimadzu, Kyoto, Japão) com uma diluição de 1/10 em água ultrapura.

Os extractos de ADN de amostras de óleos foram determinados por medição da fluorescência, na tentativa de facilitar a quantificação do ADN, uma vez que esta técnica é mais sensível do que a análise espectrofotométrica.

O ADN foi quantificado recorrendo-se ao uso de um kit de quantificação Quant-it™-Picogreen® ds DNA Kit Assay (Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. O reagente de fluorescência Picogreen® foi preparado por adição de 19,9 mL de TE 0,1x (10 mM de Tris, 1 mM de EDTA) a 100 µL de Picogreen® stock. Preparou-se uma solução de ADN padrão de concentração 2 ng/µL a partir de uma solução stock de ADN 100 µg/mL cuja absorvância foi lida a 260 nm. Os pontos da curva de calibração com as concentrações 0,002; 0,020; 0,100 e

0,200 ng/ $\mu$ L foram obtidos por diluição da solução de ADN  $\lambda$  padrão de 2 ng/ $\mu$ L. Para as leituras de fluorescência foram utilizados 10  $\mu$ L de extracto de padrões e amostras em 990  $\mu$ L de TE 0,1x (10 mM de Tris, 1 mM de EDTA) e 1000  $\mu$ L de reagente de fluorescência, numa diluição final de 1/200.

As leituras foram realizadas num espectrofluorómetro Shimadzu RF-540 (Shimadzu, Kyoto, Japão) com um comprimento de onda de excitação de 480 nm e de emissão de 520 nm. As condições definidas para as leituras foram: sensibilidade = baixa; Slit (1) = 1; Slit (2) = 6.

Ainda na tentativa de quantificar as baixas concentrações de ADN presente nos óleos, recorreu-se à análise nanofotométrica, usando um Nanophotometer<sup>TM</sup> IMPLLEN (GmbH, Munich, Alemanha). O uso desta tecnologia permitiu a determinação de concentrações de ADN muito baixas, possibilitando desta forma uma estimativa mais aproximada da quantidade de ADN presente neste tipo de extractos. Para cada determinação foram utilizados 3  $\mu$ L de extracto de ADN. Os resultados obtidos para cada amostra corresponderam à concentração de ADN presente no extracto, ao grau de pureza (razão entre as absorvâncias a 260 e 280 nm) e à razão entre as absorvâncias a 230 e 320 nm.

Como forma de confirmação dos resultados obtidos na análise espectrofotométrica para as amostras de grão de soja, estas foram também submetidas a análise por tecnologia nanofotométrica. Os parâmetros determinados incluíram os 4 comprimentos de onda anteriormente referidos.

A análise do ADN genómico extraído foi também efectuada por electroforese em gel de agarose a 1% para os extractos provenientes de grãos e farinhas. Em cada electroforese aplicaram-se 5  $\mu$ L de marcador de massa molecular HyperLadder (14 bandas, 200-10 000 pb). Cada extracto a analisar (5  $\mu$ L) foi aplicado juntamente com 2  $\mu$ L de corante de carregamento (6x). A separação electroforética foi efectuada em tampão TAE 1x (0,04 M de Tris-Acetato, 0,001 M de EDTA) a 100 V durante aproximadamente 1 hora, à temperatura ambiente. A revelação do gel efectuou-se por imersão deste numa solução de brometo de etídio (0,4  $\mu$ g/mL) durante cerca de 5 minutos, seguida de remoção do excesso de corante por imersão do gel em água durante cerca de 30 minutos. O gel de agarose foi visualizado através de um transluminador com luz UV obtendo-se o seu registo por imagem digital com o aparelho Kodak Digital Science<sup>TM</sup> DCI20 (Rochester, NY, EUA). O software de análise de imagem Kodak Digital Science<sup>TM</sup> 1D permitiu a análise das imagens e aquisição da intensidade de fluorescência de cada banda dos géis.

Os pontos de amostragem resultantes de todas as etapas de produção do óleo de soja, assim como as amostras de óleos comerciais, foram analisados em triplicado para cada um dos referidos métodos.

## 2.7. Técnicas de amplificação por PCR

### 2.7.1. PCR qualitativa

Numa primeira fase, procedeu-se à avaliação da capacidade de amplificação do ADN e simultaneamente a detecção de um gene de referência da espécie, a lectina da soja. Para tal, testaram-se e optimizaram-se 3 pares de *primers* para a lectina da soja (Tabela 12).

Em todos os extractos onde foi possível detectar o gene da lectina, procedeu-se à detecção específica da soja RR por PCR, para a qual se testaram e optimizaram as condições com 2 pares de *primers* (Tabela 12). Todos os *primers* foram sintetizados por MWG-BIOTECH AG (Ebersberg, Alemanha).

**Tabela 12 – Primers usados na PCR Qualitativa.**

Espécie Alvo	Primers	Sequências 5' – 3'	Gene Alvo	Amplificação (pb)	Referência
Soja	LE1	CAA AGC AAT GGC TAC TTC AAA G	Lectina	103	Mafra et al., 2008a
	LE2	TGA GTT TGC CTT GCT GGT CAG T			
Soja	LE3	GCA AAG CAA TGG CTA CTT CAA	Lectina	120	Mafra et al., 2008a
	LE4	AAG AAA CAG TTT CCG CTG AGT T			
Soja	GM03	GCC CTC TAC TCC ACC CCC ATC C	Lectina	118	Somma et al., 2006
	GM04	GCC CAT CTG CAA GCC TTT TTG TG			
Soja RR	GM07	ATC CCA CTA TCC TTC GCA AGA	CP4 EPSPS	169	Somma et al., 2006
	GM08	TGG GGT TTA TGG AAA TTG GAA			
Soja RR	RRS-3J1	GCA TCT ACA TAT AGC TTC TCG TTG	NOS 3'UTR/planta	106	Mafra et al., (dados não publicados)
	RRS-3J3	AAC TTCTCG ACG ATG GCC G			

<sup>a</sup> Número de acesso Genebank AJ308515.

Todas as reacções utilizaram um volume total de 25 µL, cujos componentes se apresentam na Tabela 13 para as amostras de grão de soja e na Tabela 14 para as amostras de óleos.



Os programas de tempo/temperatura utilizados no termociclador PTC-100 (MJ, Inc., Watertown, MA, EUA) otimizados para cada reacção de PCR apresentam-se na Tabela 15.

**Tabela 13** – Componentes da PCR envolvidos na amplificação de amostras de grão de soja.

Componente	Volume (μL)	
	Lectina	RR
	GM03/GM04	GM07/GM08
Água ultrapura	15,05	13,8
Tampão 10x	2,5	2,5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,25	2
dNTP (2,5 mM cada)	2	2
Primers (10 mM cada)	1	1,25
Taq Polimerase (5U/μL)	0.2	0.2
Amostra de ADN	2	2
Volume total	25	25

**Tabela 14** – Componentes da PCR envolvidos na amplificação de amostras de óleos de soja.

Componente	Volume (μL)				
	Soja			Soja RR	
	LE1/LE2	LE3/LE4	GM03/GM04	GM07/GM08	RRS-3J1/RRS-3J3
Água ultrapura	11,8	11,8	13,05	11,8	12,3
Tampão 10x	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2	2	1,25	2	2
dNTP (2,5 mM cada)	2	2	2	2	2
Primers (10 mM cada)	1,25	1,25	1	1,25	1
Taq Polimerase (5U/μL)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Amostra de ADN	4	4	4	4	4
Volume total	25	25	25	25	25

Os fragmentos de ADN obtidos por PCR foram analisados por electroforese, utilizando-se um gel de agarose a 2,0% em tampão TAE 1x (0,04 M de Tris-Acetato, 0,001 M de EDTA) durante cerca de 1h a 120 V. Em cada electroforese utilizaram-se 5 μL de marcador de massa molecular com 10 bandas de 100-1000 pb, num dos poços do gel aplicado juntamente com 4 μL de corante de carregamento (6x). Cada amostra foi aplicada na quantidade de 10 μL de extracto das amostras de grão e 20 μL de

extracto das amostras de óleo, para cada um dos poços do gel conjuntamente com o corante de carregamento.

**Tabela 15** – Condições de tempo e temperatura utilizadas na PCR qualitativa

Espécie alvo	Soja						Soja RR			
	LE1/LE2		LE3/LE4		GM03/GM04		GM07/GM08		RRS-3J1/RRS-3J3	
Primers	Temp.	Tempo	Temp.	Tempo	Temp.	Tempo	Temp.	Tempo	Temp.	Tempo
Desnaturação	94°C	4 min	94°C	4 min	95°C	5 min	95°C	5 min	94°C	4 min
Amplificação	94°C	30 s	94°C	30 s	95°C	30 s	95°C	30 s	94°C	30 s
	60°C	30 s	60°C	30 s	65°C	30 s	55°C	30 s	60°C	30 s
	72°C	30 s	72°C	30 s	72°C	1 min	72°C	1 min	72°C	30 s
Nº de ciclos	35		35		37		35		38	
Extensão final	72°C	4 min	72°C	4 min	72°C	5 min	72°C	5 min	72°C	4 min

A revelação do gel efectuou-se por imersão deste numa solução de brometo de etídio (0,4 µg/mL) durante cerca de 5 minutos, seguida de remoção do excesso de corante por imersão do gel em água durante cerca de 30 minutos. O gel de agarose foi visualizado através de um transluminador com luz UV obtendo-se o seu registo por imagem digital com o aparelho Kodak Digital Science<sup>TM</sup> DCI20 (Rochester, NY, EUA).

## 2.7.2. PCR em tempo real

A técnica de PCR em tempo real teve também como objectivo detectar a lectina da soja e a soja RR.

A técnica baseou-se na metodologia descrita na ISO 21570 (2005) para a detecção quantitativa da soja RR por PCR em tempo real com algumas alterações. A técnica consistiu na utilização de sondas de hidrólise do tipo TaqMan<sup>TM</sup> cujas sequências se apresentam na Tabela 16, juntamente com os respectivos *primers* para a lectina da soja e para a construção específica da soja RR.

A amplificação por PCR em tempo real foi efectuada num volume de reacção de 20 µL, contendo 2 µL de extracto de ADN no caso das amostras de grão de soja e 4 µL no caso de extractos de óleos. Todas as reacções continham de 10 µL de iQ<sup>TM</sup> Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) 1x, 900 nM de cada *primer* e 100

nM de cada sonda (Tabela 17). As reacções foram efectuadas num termociclador em tempo real iCycler iQ™ Multicolor Real-Time Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hércules, CA, EUA) utilizando-se as seguintes condições: 1 minuto a 95°C; 50 ciclos de 30 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C, com a detecção de fluorescência no final de cada ciclo. Os dados obtidos foram processados com o auxílio do software Optical System versão 3.1 (Bio-Rad Laboratories, Hércules, CA, EUA). Todas as amostras foram amplificadas em triplicado para cada um dos alvos, em cada ensaio de PCR em tempo real.

**Tabela 16 – Primers e sondas utilizados em PCR em tempo real.**

<b>Espécie</b>	<b>Primers e Sondas</b>	<b>Sequências 5' – 3'</b>	<b>Gene Alvo</b>	<b>Amplificação (pb)</b>	<b>Referência</b>
Soja	Lectin-F	TCC ACC CCC ATC CAC ATT T	Lectina	81	ISO 21570
	Lectin-R	GGC ATA GAA GGT GAA GTT GAA GGA			
	Lectin-TMP	FAM-AAC CGG TAG CGT TGC CAG CTT CG-BHQ2			
Soja RR	RRS-F	GCC ATG TTG TTA ATT TGT GCC AT	Junção CTP/35S	83	ISO 21570
	RRS- R	GAA GTT CAT TTC ATT TGG AGA GGA C			
	RRS-TMP	FAM-CTT GAA AGA TCT GCT AGA GTC AGC TTG TCA GCG-BHQ2			

FAM – 6-Carboxifluoresceína, BHQ2 – Blackhole Quencher 2

**Tabela 17 – Componentes utilizados no PCR em tempo real.**

<b>Componente</b>	<b>Volume (µL)</b>			
	<b>Amostras Sólidas</b>		<b>Amostras Líquidas</b>	
	<b>Lectina</b>	<b>RR</b>	<b>Lectina</b>	<b>RR</b>
Água ultrapura	4,2	4,2	2,2	2,2
iQ™ SuperMix	10	10	10	10
Primers	1,8	1,8	1,8	1,8
Sondas	0,2	0,2	0,2	0,2
ADN	2	2	4	4
Volume total	20	20	20	20

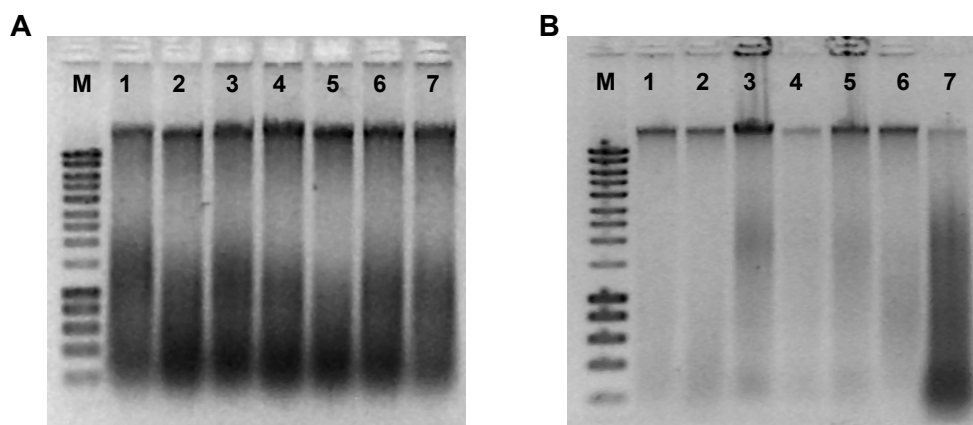


## 2.8. Análise de ADN em amostras de grãos

### 2.8.1. Avaliação do ADN extraído

Para a análise do ADN obtido a partir das amostras de grãos de soja correspondentes às 4 etapas preparativas para a extracção do óleo de soja e ao subproduto (farinha) resultante, procedeu-se à sua extracção de acordo com os métodos Wizard e CTAB (secção 2.5.1.1 e 2.5.1.2, respectivamente). A título comparativo, entre o ADN extraído a partir de soja GM e o ADN de soja convencional, foram também incluídas 2 amostras de grãos de soja provenientes da indústria e rotuladas como não GM. Estas amostras foram extraídas pelos mesmos métodos já referidos e atendendo a todos os cuidados necessários de forma a evitar a contaminação com soja GM.

Para avaliação da qualidade do ADN extraído, procedeu-se à electroforese em gel de agarose dos extractos obtidos para visualização do ADN genómico. Pela Figura 25, podem observar-se bandas intensas, com tamanho superior a 10 kb, de ADN extraído para as amostras das 4 etapas preparativas para a extracção do óleo de soja (linhas 3-7) e para as duas amostras de grãos convencionais (linhas 1 e 2).



**Figura 25** – Electroforese em gel de agarose do ADN genómico das amostras de grãos de soja extraído pelos métodos Wizard (A) e CTAB (B): linhas 1 e 2 – grãos convencionais; linha 3 – grão GM; linha 4 – grão partido; linha 5 – grão laminado; linha 6 – grão extrudido; linha 7 – subproduto da extracção de óleo (farinha); linha M – marcador HyperLadder I (Bioline, London, Reino Unido).

A elevada intensidade das bandas obtidas com os dois métodos de extracção é indicativa de elevada concentração e integridade do ADN nos extractos. O ADN extraído pelo método Wizard evidenciou algum arrastamento resultante da degradação do ADN e contaminação com ARN (Figura 25A). O método CTAB não evidenciou a

presença de ADN degradado ou contaminação por ARN, à excepção do subproduto na linha 7 (Figura 25B). Contudo, estes extractos apresentam bandas menos intensas do que as obtidas dos extractos extraídos pelo método Wizard. A degradação de ADN observada na linha 7 (amostra proveniente do subproduto de extracção do óleo), cujo ADN foi extraído pelo método de CTAB, pode ter resultado da etapa de extracção do óleo, no entanto, o mesmo não foi verificado na mesma amostra extraída pelo método Wizard.

A qualidade dos extractos de ADN foi também avaliada por espectrofotometria UV a partir do cálculo da razão entre a leitura de absorvâncias a 260 nm e 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ), considerando-se um extracto puro para razões entre 1,8 e 2,0. Por outro lado, as leituras da absorvância a 260 nm permitem determinar a concentração de ADN nos extractos obtidos. Os resultados da Tabela 18 mostram que o ADN extraído pelo método Wizard apresenta um elevado valor de pureza, uma vez que os valores de  $A_{260}/A_{280}$  são em geral superiores a 1,7. O rendimento do ADN extraído foi elevado para este método, sendo em geral superior a 600 ng/ $\mu$ L (60  $\mu$ g/100 mg de amostra) (Tabela 18). Por outro lado, os extractos obtidos pelo método CTAB apresentaram valores de pureza inferiores aos do método Wizard ( $<1,7$ ), com a excepção da amostra correspondente ao subproduto da extracção do óleo (Figura 25B – linha 7) que apresentou um valor de pureza de 1,9 (Tabela 18). A concentração de ADN nos extractos obtidos por CTAB foi cerca de dez vezes inferior, à concentração de ADN nos extractos obtidos pelo método Wizard, à excepção da amostra de farinha que revelou um valor de concentração de ADN na mesma ordem de grandeza dos obtidos no método Wizard. Este valor pode ser explicado pela presença de elevada concentração de ADN degradado, que se pode verificar por electroforese do ADN genómico (Figura 25B, linha 7).

Os valores de concentração de ADN obtidos por espectrofotometria foram, em geral, concordantes com as respectivas intensidades das bandas observadas por electroforese em gel de agarose. Os extractos de soja obtidos pelo método Wizard apresentaram bandas muito intensas para qualquer uma das amostras testadas, juntamente com elevada concentração de ADN degradado (Figura 25A), enquanto que os extractos obtidos pelo método CTAB revelaram bandas menos intensas, sendo a banda de menor intensidade (Figura 25B, linha 4) a correspondente à amostra de menor concentração de ADN (Tabela 18). Os valores obtidos, quer para as amostras de soja GM quer para as amostras de soja convencional, são da mesma ordem de grandeza dentro de cada método. A soja convencional serviu apenas como amostra de comparação para os métodos de extracção, detecção e quantificação do ADN, como poderá ser verificado ao longo deste estudo.

Pela análise dos géis da Figura 25 concluiu-se que ambos os métodos permitiram a extracção de ADN genómico de elevada massa molecular a partir de amostras provenientes de grãos de soja, conforme demonstrado na literatura (Mafra et al., 2008a). Atendendo aos resultados obtidos, pode-se concluir que o método Wizard permite a obtenção de extractos de ADN com elevada pureza e com rendimentos cerca de 10x superiores aos obtidos pelo método CTAB, pelo que, aliado ao facto da maior simplicidade do protocolo Wizard o torna preferencial para este tipo de amostras.

**Tabela 18** – Pureza, concentração dos extractos de ADN (média  $\pm$  desvios padrão) das amostras provenientes das etapas de preparação para a extracção e subproduto pós-extracção (farinha) do óleo de soja GM, e comparação com a soja convencional por espectrofotometria UV.

Amostras de soja	CTAB		Wizard	
	Concentração (ng/ $\mu$ L)	Pureza $A_{260}/A_{280}$	Concentração (ng/ $\mu$ L)	Pureza $A_{260}/A_{280}$
Grão Convencional (1)	74,0 $\pm$ 4,9	1,63 $\pm$ 0,16	848,8 $\pm$ 40,7	1,80 $\pm$ 0,22
Grão Convencional (2)	74,5 $\pm$ 8,5	1,48 $\pm$ 0,21	923,8 $\pm$ 19,4	1,87 $\pm$ 0,06
Grão GM	81,8 $\pm$ 6,0	1,07 $\pm$ 0,13	755,0 $\pm$ 28,3	1,73 $\pm$ 0,10
Grão Partido GM	35,0 $\pm$ 8,5	1,23 $\pm$ 0,13	803,8 $\pm$ 12,4	1,79 $\pm$ 0,13
Grão Laminado GM	81,8 $\pm$ 10,3	1,33 $\pm$ 0,11	965,0 $\pm$ 21,2	1,69 $\pm$ 0,05
Grão Extrudido GM	74,3 $\pm$ 11,0	1,51 $\pm$ 0,04	730,0 $\pm$ 28,3	1,81 $\pm$ 0,01
Farinha GM	680,0 $\pm$ 0,0	1,92 $\pm$ 0,06	636,3 $\pm$ 12,4	1,60 $\pm$ 0,00

$A_{260}$  – absorvância a 260 nm,  $A_{280}$  – absorvância a 280 nm.

A tecnologia nanofotométrica tem vindo a tornar-se no método de eleição para as determinações da concentração e pureza do ADN em extractos obtidos a partir das mais variadas matrizes. A grande vantagem desta técnica reside na possibilidade de se efectuarem leituras com volumes de amostra muito reduzidos (1-5  $\mu$ L), o que permite a análise directa do extracto sem necessidade de efectuar diluição. Esta análise foi também aplicada às amostras extraídas pelo método Wizard, com o intuito de confirmar os valores anteriormente obtidos por espectrofotometria UV convencional. Os resultados obtidos pela análise nanofotométrica (Tabela 19) mostraram que os valores obtidos foram próximos dos obtidos pela técnica convencional contudo, em geral, foram ligeiramente superiores aos anteriormente obtidos, possivelmente devido aos erros associados às diluições (Tabela 18).

**Tabela 19** – Pureza, concentração dos extractos de ADN (média  $\pm$  desvios padrão) das amostras provenientes das etapas de preparação para a extracção e subproduto pós-extracção (farinha) do óleo de soja GM, e comparação com a soja convencional por análise nanofotométrica.

Extracção pelo método Wizard		
Amostras de soja	Concentração (ng/ $\mu$ L)	Pureza $A_{260}/A_{280}$
Grão Convencional (1)	950,0 $\pm$ 21,2	1,86 $\pm$ 0,00
Grão Convencional (2)	963,0 $\pm$ 20,2	1,84 $\pm$ 0,01
Grão GM	883,5 $\pm$ 16,7	1,87 $\pm$ 0,01
Grão Partido GM	956,5 $\pm$ 12,0	1,78 $\pm$ 0,04
Grão Laminado GM	847,5 $\pm$ 3,50	1,83 $\pm$ 0,01
Grão Extrudido GM	716,5 $\pm$ 4,90	1,73 $\pm$ 0,00
Farinha GM	760,0 $\pm$ 2,80	1,68 $\pm$ 0,02

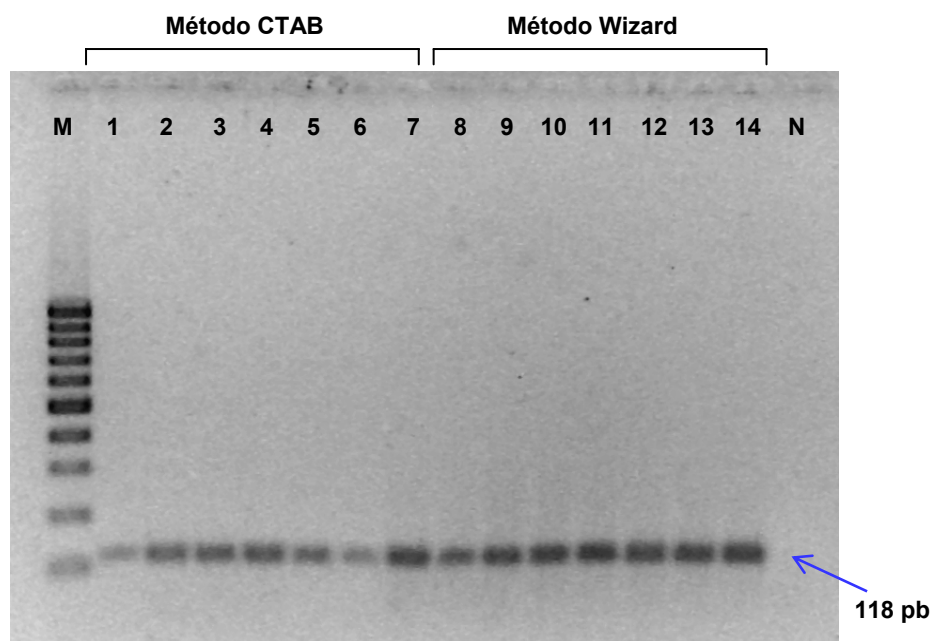
$A_{260}$  – absorvância a 260 nm,  $A_{280}$  – absorvância a 280 nm.

## 2.8.2. PCR Qualitativa

A técnica de PCR qualitativa foi utilizada, numa primeira fase, para a amplificação do ADN dos extractos provenientes das etapas de preparação dos grãos para a extracção do óleo de soja e para o subproduto da extracção (farinha) com o objectivo de detectar um gene de referência da espécie – a lectina da soja. Este gene é o mais vulgarmente utilizado para a identificação da soja, sendo a sua amplificação efectuada com os *primers* GM03/GM04 (Tabela 12) (Anklam et al., 2002 e Meyer e Jaccaud, 1997). Estes *primers* têm sido largamente utilizados na detecção da lectina da soja, servindo como um sistema de controlo, no qual uma banda específica de 118 pb confirma a adequação do ADN para amplificação por PCR (Querci et al., 2006). Os *primers* GM03/GM04 levam à amplificação de um fragmento de tamanho adequado para amostras de alimentos crus e processados, pelo que foram utilizados neste trabalho. Os resultados mostraram que todas as amostras amplificaram o gene da lectina (Figura 26), confirmando a presença de soja em todas as fases de preparação para a extracção do óleo de soja (linhas 3-6 e 10-13) e no subproduto posterior à extracção (farinha, linhas 7 e 14), em extractos obtidos pelos métodos de extracção de ADN (Wizard e CTAB). Em conjunto com as amostras de soja das etapas preparativas para extracção de óleo e do subproduto da extracção (farinha), foram incluídas na análise mais 2 amostras de soja convencional com o intuito de se avaliarem possíveis diferenças entre os 2 tipos de soja. De forma idêntica à soja GM, as 2 amostras de soja convencional amplificaram positivamente o gene da lectina da soja (linhas 1, 2, 8, 9, Figura 26). Os extractos de ADN testados foram diluídos para 100 ng/ $\mu$ L para os



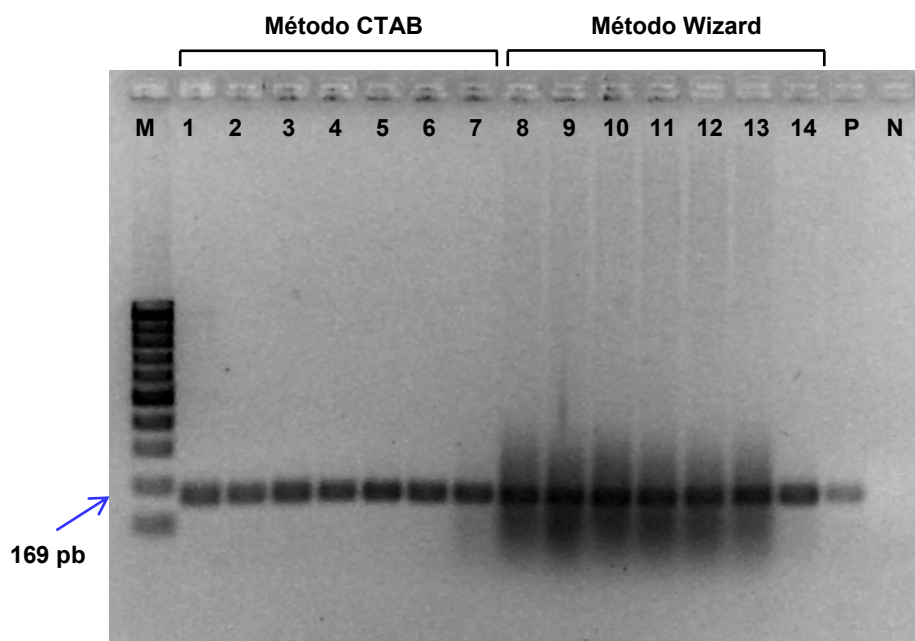
extractos obtidos por Wizard, enquanto os extractos obtidos pelo método CTAB não foram diluídos por apresentarem concentrações inferiores a 100 ng/μL (Tabela 18), o que está concordante com a menor intensidade das bandas dos produtos de PCR obtidos com o método CTAB (linhas 1-7, Figura 26) em comparação com o método Wizard (linhas 8-14, Figura 26).



**Figura 26** – Electroforese em gel de agarose dos produtos de PCR resultantes da amplificação do gene da lectina da soja (*primers* GM03/GM04) de amostras provenientes das etapas de preparação para a extracção do óleo de soja GM e subproduto pós-extracção (farinha), extraídas pelos métodos CTAB (linhas 1-7) e Wizard (linhas 8-14): linhas 1-2 e 8-9 – grãos convencionais; linhas 3 e 10 – grão de soja; linhas 4 e 11 – grão partido; linhas 5 e 12 – grão laminado; linhas 6 e 13 – grão extrudido; linhas 7 e 14 – farinha de soja; linha N – controlo negativo, linha M – marcador de 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha).

A detecção da soja RR foi efectuada com os *primers* GM07/GM08 (Tabela 12), na detecção específica da soja RR, por amplificação de fragmentos de ADN com 169 pb do gene *CP4 EPSPS* (Querci et al., 2006). Os resultados demonstraram que todas as amostras amplificaram em presença dos *primers* específicos para a soja RR, confirmando a sua presença em todas as fases de preparação para a extracção do óleo de soja e no subproduto da extracção do mesmo (linhas 3-7 e 10-14, Figura 27), obtidas pelos dois métodos de extracção de ADN utilizados (Wizard e CTAB). Nesta reacção foram utilizados extractos de ADN com 200 ng/μL para as amostras obtidas pelo método Wizard, razão pela qual o gel apresenta bandas muito concentradas e com elevado arrastamento (linhas 8-14, Figura 27). Esta concentração foi utilizada com o intuito de se obterem bandas de ADN GM bem visíveis, no entanto, dada a elevada concentração de ADN, verificou-se que esta concentração não seria

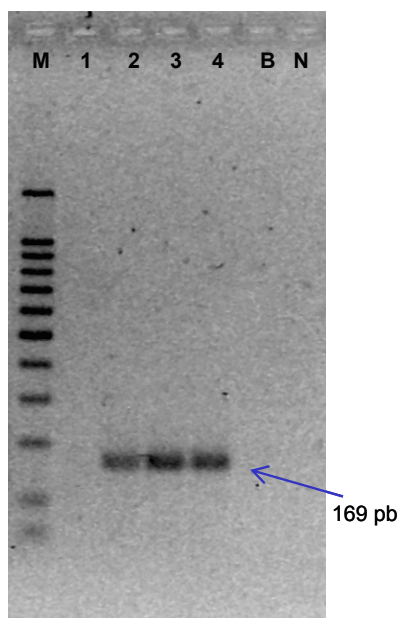
necessária. As duas amostras de soja convencional incluídas para comparação também amplificaram positivamente a soja RR (linhas 1, 2, 8 e 9, Figura 27), facto este não expectável, uma vez que estas amostras estavam rotuladas como não GM. Este resultado foi confirmado por ensaios de PCR em triplicado e de extractos em duplicado.



**Figura 27** – Electroforese em gel de agarose dos produtos de PCR resultantes da amplificação específica do evento da soja RR (*primers* GM07/GM08) de amostras provenientes das etapas de preparação para a extracção do óleo de soja GM e subproduto pós-extracção (farinha), extraídas pelos métodos CTAB (linhas 1-7) e Wizard (linhas 8-14): linhas 1-2 e 8-9 – grãos convencionais; linhas 3 e 10 – grão de soja; linhas 4 e 11 – grão partido; linhas 5 e 12 – grão laminado; linhas 6 e 13 – grão extrudido; linhas 7 e 14 – farinha de soja; linha N – controlo negativo, linha P – controlo positivo; linha M – marcador de 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha).

Um das confirmações do resultado anterior para a presença de soja RR nas amostras de soja convencional foi efectuada juntamente com outras duas amostras disponibilizadas pela indústria, incluindo uma datada do ano 2000 e outra obtida juntamente com as duas amostras anteriormente analisadas. Os resultados obtidos evidenciaram uma amplificação positiva da soja RR para 3 das amostras obtidas mais recentemente (2006) (linhas 2-4, Figura 28), confirmando o resultado anterior. Apenas a amostra mais antiga confirmou a ausência de soja RR (linha 1, Figura 28). Desta forma, os grãos rotulados como não GM de colheitas recentes e lotes diferentes parecem estar contaminados com soja RR. Este facto está sem dúvida associado à utilização frequente de soja GM na produção de óleo de soja, cujo armazenamento industrial levará inevitavelmente à contaminação de soja convencional por soja GM. Para além disso, a contaminação poderá também ocorrer durante a produção agrícola,

armazenamento e transporte. Este facto poderá justificar algum do receio existente entre a comunidade científica e ambientalista, que realçam as possíveis contaminações durante a produção agrícola de produtos convencionais com colheitas GM.



**Figura 28** – Electroforese em gel de agarose dos produtos de PCR resultantes da amplificação específica do evento da soja RR (*primers* GM07/GM08) de amostras provenientes de grãos de soja convencional: linha 1 – grão de soja convencional (ano 2000); linhas 2-4 – grãos de soja convencional (ano 2006); linha B – branco de extracção; linha N – controlo negativo; linha M – marcador de 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha).

### 2.8.3. PCR em Tempo Real

Dado que foi evidente a amplificação de ADN de extractos obtidos a partir de grãos de soja correspondentes às etapas de preparação para a extracção do óleo de soja e ao subproduto após extracção (farinha) por PCR qualitativa, procedeu-se à análise por PCR em tempo real.

Numa primeira abordagem, pretendeu-se com a técnica de PCR em tempo real confirmar os resultados obtidos pela PCR qualitativa. A utilização da técnica de PCR em tempo real com sondas de hidrólise do tipo TaqMan<sup>TM</sup> permitiu aumentar a especificidade da reacção e, deste modo, confirmar os resultados anteriormente obtidos para a detecção da lectina da soja e detecção da soja RR.

A segunda abordagem da PCR em tempo real relacionou-se com um dos principais objectivos na análise de OGM em alimentos, o qual se prende com a sua

quantificação. Neste trabalho, procedeu-se ao traçado de duas curvas de calibração a partir do material de referência certificado com 5% de soja RR (Fluka, Chemie GmbH; Sigma-Aldrich; Steinheim, Alemanha), extraído pelo método Nucleospin® food kit. O extracto do material de referência (200 ng/μL) foi diluído seriadamente de forma a obter-se um intervalo de concentrações, o mais adequado possível, para o gene da lectina e da soja RR (Tabela 20). O número de cópias de ADN para a soja foi calculado, sabendo que uma cópia de ADN genómico haplóide de *Glycine max* L. corresponde a 1,13 pg de ADN (Rott et al., 2004).

**Tabela 20** – Concentrações de ADN, nº de cópias de ADN usadas e valores de Ct obtidos por amplificação por PCR em tempo real (média ± desvios padrão) para a lectina da soja e soja RR, utilizando padrões de ADN.

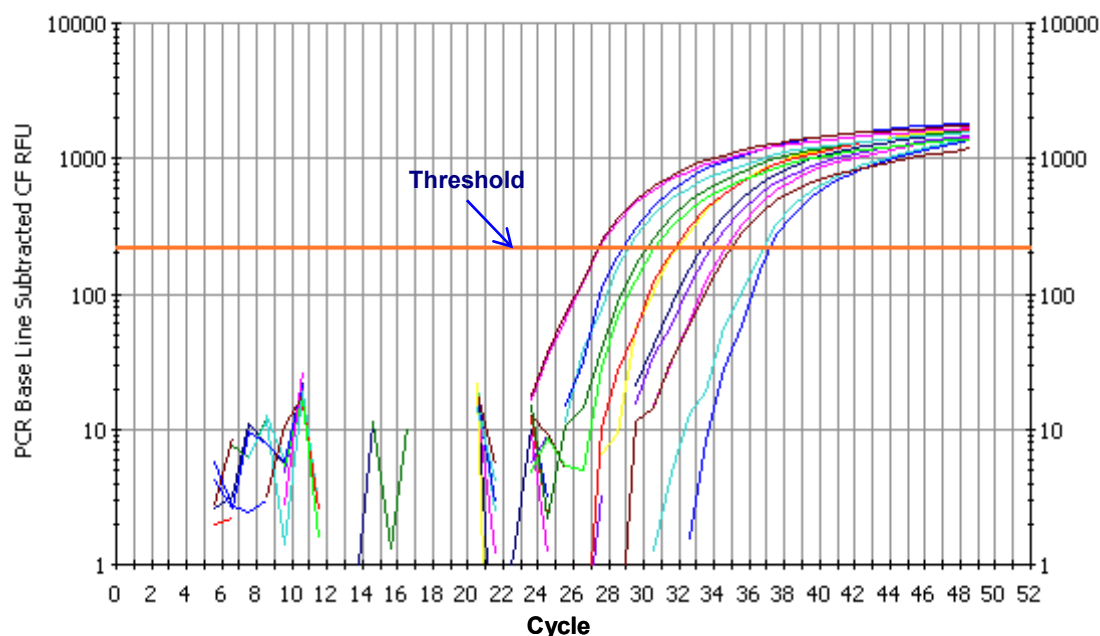
Padrões de Soja (ng/μL)	Lectina		RR	
	Número de cópias	Ct	Número de cópias	Número de cópias
200		NU	17699,1	30,73 ± 0,05
66,7	117994,1	27,35 ± 0,04	5899,7	32,31 ± 0,38
22,2	39331,4	28,97 ± 0,23	1966,6	33,94 ± 0,09
7,41	13110,5	30,36 ± 0,28	655,5	35,82 ± 0,46
2,47	4370,2	31,77 ± 0,11	218,6	37,30 ± 0,31
0,823	1456,7	33,53 ± 0,40		ND
0,274	485,6	34,76 ± 0,21		ND
0,0913	161,6	36,93 ± 0,27		NU

ND – amplificação não detectada; NU – padrão não utilizado na curva; Ct – Cycle threshold

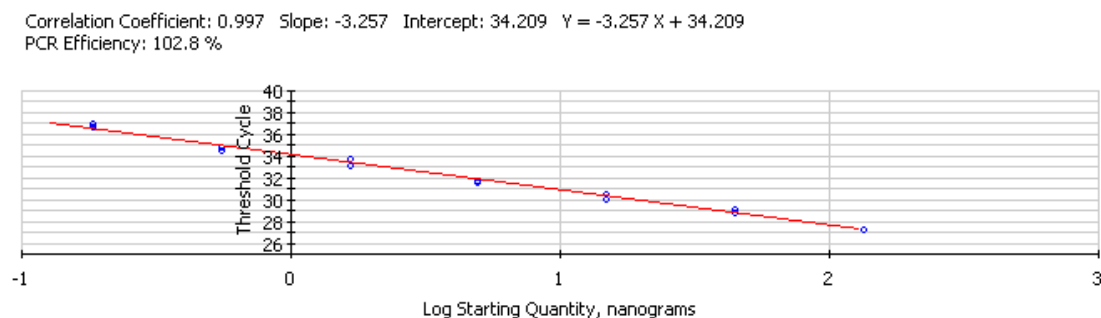
A Figura 29 apresenta os resultados da amplificação dos padrões (em duplicado) para a curva de calibração da lectina da soja. O cálculo dos Ct (Tabela 20), obtido pela intersecção de cada curva de fluorescência com a linha *threshold*, permitiu o traçado da curva de calibração da Figura 30. Pela análise do gráfico (Figura 30), verifica-se que se obteve uma boa correlação linear dos pontos da curva ( $r^2=0,997$ ), e uma eficiência de 102,8% da reacção próxima do ideal ( $\geq 90\%$ ) (La Paz et al., 2006).

Paralelamente à amplificação do gene da lectina, procedeu-se à amplificação da soja RR por PCR em tempo real utilizando os extractos padrão (Tabela 20). Na Figura 31 podem-se observar as curvas de fluorescência em função do número de ciclos de PCR em tempo real que permitiram o traçado da curva de calibração para a soja RR (Figura 32). Pela análise do gráfico (Figura 32) verifica-se que se obteve uma

boa correlação entre os pontos da curva ( $r^2=0,995$ ), com uma eficiência da PCR (93,4%) no intervalo dos valores recomendados para a técnica.



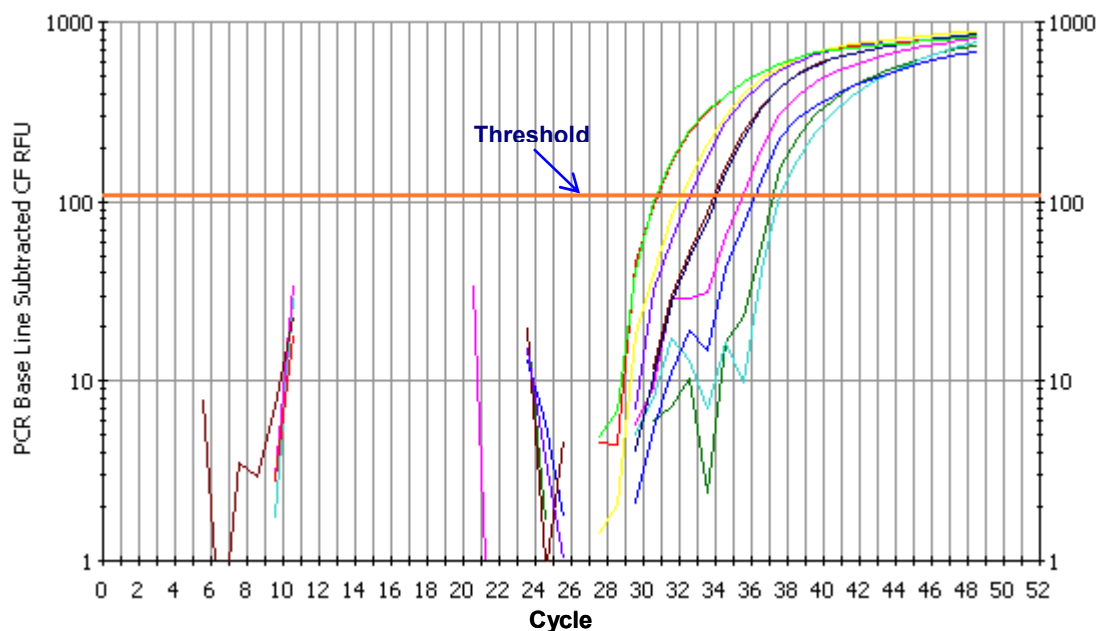
**Figura 29** – Gráfico da função logarítmica da fluorescência em função do número de ciclos de PCR em tempo real por amplificação do gene da lectina e utilização de sondas de hidrólise do tipo TaqMan™.



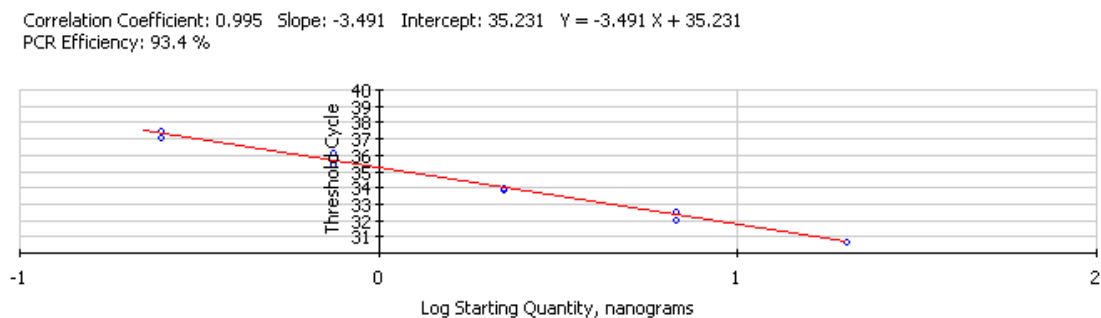
**Figura 30** – Curva de calibração da quantidade de ADN de soja amplificado por PCR em tempo real para o gene da lectina em função do Ct.

Com o traçado das curvas de calibração para a lectina da soja, como gene de referência, e para a soja RR, procedeu-se à determinação da quantidade de ADN proveniente da soja total e da soja RR nas amostras correspondentes aos grãos de soja. Todas as amostras foram amplificadas em triplicado e em paralelo com os

respectivos padrões para as curvas de calibração, incluindo sempre um extracto de material de referência certificado ( $1,0 \pm 0,16\%$ ) para validação da técnica.



**Figura 31** – Gráfico da função logarítmica da fluorescência em função do número de ciclos de PCR em tempo real por amplificação da soja RR e utilização de sondas de hidrólise do tipo TaqMan™.



**Figura 32** – Curva de calibração da quantidade de ADN de soja amplificado por PCR em tempo real para a soja RR em função do Ct.

Nas Tabela 21 e Tabela 22 apresentam-se os resultados da amplificação da lectina da soja e da soja RR, respectivamente, para os grãos de soja ao longo da preparação para a extracção, subproduto após extracção do óleo (farinha) e uma amostra de soja rotulada como não GM. Os valores de Ct obtidos permitiram, por interpolação nas respectivas curvas de calibração, obter a quantidade de ADN alvo

presente nos extractos das referidas amostras (Tabela 21 e Tabela 22) para o cálculo da proporção de soja RR utilizou-se a seguinte expressão:

$$\% \text{ OGM} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de cópias de ADN da soja RR}}{\text{n}^\circ \text{ de cópias de ADN da lectina da soja}} \times 100$$

Na Tabela 22 apresentam-se os valores percentuais de soja RR nas amostras e padrão de validação. O valor obtido para o padrão de validação (1,03%) foi concordante com o esperado ( $1,0 \pm 0,16\%$ ), o que permitiu aferir a adequação da técnica para a quantificação da soja RR. Os valores obtidos para os grãos de soja ao longo do processo industrial mostraram uma proporção de material GM elevada (50%), conforme seria de prever. De referir que, as percentagens obtidas nas várias etapas são aproximadamente concordantes, sendo as pequenas variações provavelmente devidas à manipulação das amostras durante a respectiva extracção. A amostra de grão industrial rotulada como não GM apresentou um resultado concordante com o anteriormente obtido por PCR qualitativa para a presença de soja RR. O valor de 10% obtido significa, provavelmente, a dificuldade de evitar contaminações da soja convencional com soja RR durante a produção agrícola e/ou armazenamento industrial.

**Tabela 21** – Resultados obtidos por PCR em tempo real (média  $\pm$  desvios padrão) relativos à amplificação do gene da lectina da soja para as amostras das etapas de preparação para a extracção do óleo e subproduto após extracção (farinha).

Amostras de soja	Ct	Gene Lectina	
		Quantidade de ADN (ng)	Número de cópias de ADN
Grão GM	27,73 $\pm$ 0,07	97,55 $\pm$ 4,88	86327,4
Grão Partido GM	27,54 $\pm$ 0,01	111,5 $\pm$ 0,7	98672,6
Grão Laminado GM	29,14 $\pm$ 0,06	36,10 $\pm$ 1,41	31946,9
Grão Extrudido GM	27,06 $\pm$ 0,07	156,5 <sup>a</sup> $\pm$ 7,8	138495,6
Farinha GM	27,28 $\pm$ 0,06	134,5 $\pm$ 5,0	119026,5
Grão Convencional	28,04 $\pm$ 0,01	78,65 $\pm$ 0,21	69601,8
Padrão de validação 1% GM	27,84 $\pm$ 0,00	90,30 $\pm$ 0,12	79911,5

a – valor obtido por extrapolação à recta, por se encontrar ligeiramente acima do ponto máximo da curva de calibração;  
Ct – *Cycle threshold*.

**Tabela 22** – Resultados obtidos por PCR em tempo real (média  $\pm$  desvios padrão) relativos à amplificação da soja RR para as amostras das etapas de preparação para a extracção do óleo e subproduto após extracção (farinha).

Amostras de soja	Construção específica soja RR			
	Ct	Quantidade de ADN (ng)	Número de cópias de ADN	% de ADN GM
Grão GM	29,17 $\pm$ 0,11	54,63 $\pm$ 3,76	48348,1	56,01
Grão Partido GM	29,29 $\pm$ 0,19	50,70 $\pm$ 6,41	44867,7	45,47
Grão Laminado GM	30,70 $\pm$ 0,05	19,83 $\pm$ 0,68	17551,6	54,94
Grão Extrudido GM	28,97 $\pm$ 0,13	62,30 $\pm$ 5,14	55132,7	39,81
Farinha GM	28,74 $\pm$ 0,02	72,60 $\pm$ 0,85	64247,8	53,98
Grão Convencional	32,10 $\pm$ 0,02	7,91 $\pm$ 0,08	7000,0	10,06
Padrão de validação 1% GM	34,32 $\pm$ 0,19	0,93 $\pm$ 0,13	823,0	1,03

Ct – Cycle threshold.

## 2.9. Análise de ADN em amostras de óleos

### 2.9.1. Avaliação do ADN extraído

Sabendo que a extracção de ADN de óleos de é uma tarefa muito difícil, uma vez que é uma matriz com baixa quantidade de ADN e que, no caso particular dos óleos refinados, possui baixa integridade, procedeu-se à optimização de 4 protocolos de extracção para a matriz óleo. Os 4 métodos foram o CTAB, o Wizard, o Nucleospin® food kit e o Wizard® Magnetic DNA purification system for food conforme descrito nas secções 2.5.2.1 a 2.5.2.4.

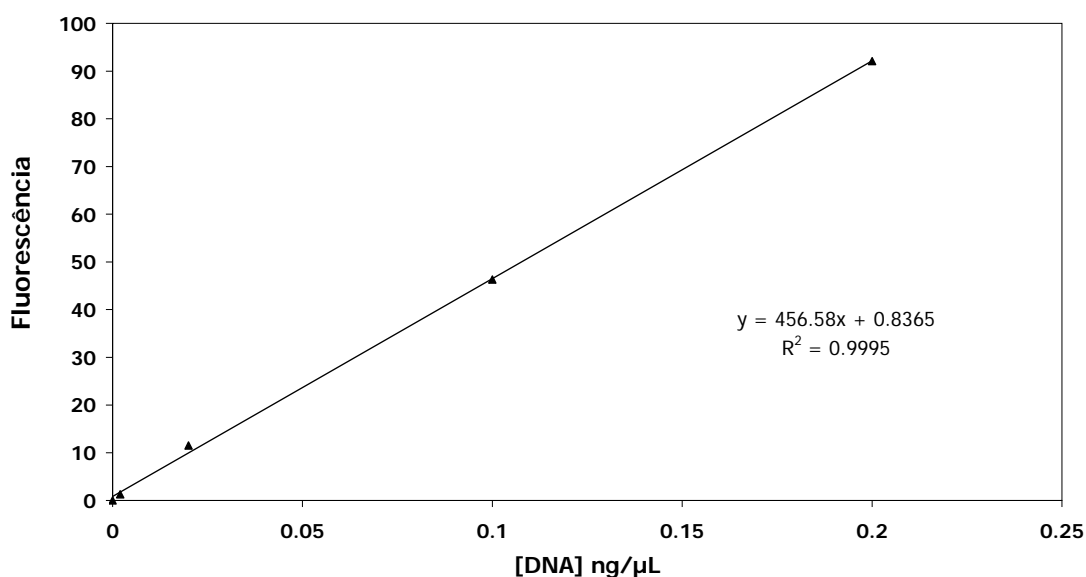
As amostras de óleos incluíram a etapa de extracção (óleo cru) e as etapas de refinação (óleo neutralizado, lavado, branqueado e desodorizado) (Figura 5, secção 1.4.1) e amostras de óleos vegetais comercializados (Figura 17). Como a quantidade e integridade do ADN neste tipo de extractos são reduzidas, não se procedeu à análise do ADN extraído por electroforese em gel de agarose, tal como foi efectuado para os extractos provenientes de grão. Assim, passou-se directamente para a quantificação do ADN. A primeira quantificação decorreu por espectrofotometria UV em cuvete de volume reduzido (100  $\mu$ L), o que implicou necessariamente a diluição do extracto (10  $\mu$ L de extracto + 90  $\mu$ L de água ultrapura). Para tal, testaram-se extractos de óleo cru onde se previa a maior concentração de ADN, não se tendo observado absorvância detectável a 260 nm.



Deste modo, procedeu-se à quantificação por fluorescência, por ser uma técnica mais sensível e específica para a quantificação do ADN. Nesta determinação utilizou-se o Quant-it™-Picogreen® ds DNA Kit Assay conforme descrito na secção 2.6 e optimizaram-se as condições do espectrofluorómetro de forma a maximizar a sensibilidade. Os padrões de ADN utilizados e respectivas leituras de fluorescência apresentam-se na Tabela 23, os quais permitiram a construção da curva de calibração da Figura 33.

**Tabela 23** – Concentrações dos padrões de ADN usados e respectivos valores de fluorescência.

Padrões de ADN	Concentração do ADN (ng/μL)	Fluorescência
0	0,000	0,0
1	0,002	1,3
2	0,020	11,5
3	0,100	46,3
4	0,200	92,1



**Figura 33** – Curva de calibração para a determinação da concentração de ADN de amostras de óleos obtida por espectrofluorimetria com a utilização do kit de fluorescência Quant-it™-Picogreen® ds DNA Kit Assay.

Os valores de fluorescência foram quase não detectáveis para todos os extractos de ADN obtidos pelos 4 métodos de extracção a partir de amostras de óleos comerciais, bem como, para as amostras das etapas correspondentes à refinação do

óleo de soja. Este facto deveu-se, em parte, à diluição necessária das amostras para a realização desta determinação conforme também obtido por espectrofotometria UV.

Como última tentativa para quantificar o ADN dos extractos de óleos, procedeu-se à análise nanofotométrica, uma vez que só no final deste trabalho foi possível a utilização deste tipo de equipamento. A Tabela 24 apresenta os resultados obtidos para as concentrações de ADN e respectivos valores de pureza para as amostras das etapas de refinação do óleo de soja extraídas com o kit Nucleospin®.

**Tabela 24** – Concentração e pureza (média  $\pm$  desvio padrão) do ADN dos extractos das amostras das etapas de refinação do óleo de soja por análise nanofotométrica.

<b>Extracção por Nucleospin® food kit</b>		
<b>Amostras das etapas de refinação</b>	<b>Concentração (ng/<math>\mu</math>L)</b>	<b>Pureza <math>A_{260}/A_{280}</math></b>
Óleo Cru	28,3 $\pm$ 0,4	1,95 $\pm$ 0,02
Óleo Neutralizado	4,50 $\pm$ 0,00	1,61 $\pm$ 0,08
Óleo Lavado	3,90 $\pm$ 1,27	1,21 $\pm$ 0,01
Óleo Branqueado	32,5 $\pm$ 7,1	1,23 $\pm$ 0,09
Óleo desodorizado	5,13 $\pm$ 1,24	1,27 $\pm$ 0,08

$A_{260}$  – absorvância a 260 nm,  $A_{280}$  – absorvância a 280 nm.

Das amostras analisadas os óleos, cru e branqueado, foram os que permitiram obter as concentrações mais elevadas de ADN, tendo as restantes amostras apresentado valores mais baixos. Apenas os óleos cru e neutralizado permitiram a obtenção de extractos de ADN considerados puros ( $A_{260}/A_{280} > 1,6$ ).

As amostras de óleos comerciais foram extraídas pelos 4 métodos referidos para análise comparativa dos protocolos de extracção aplicados a óleos refinados.

Nas Tabela 25 e Tabela 26 apresentam-se os valores de concentração e pureza obtidas por análise nanofotométrica UV. O método Wizard® Magnetic foi o que permitiu valores de concentração de ADN e de pureza mais elevados nos extractos, enquanto que os restantes métodos (Tabela 25 e Tabela 26) foram os que apresentaram valores de concentrações mais baixos e variáveis. Verificou-se que a tecnologia nanofotométrica permitiu a detecção de concentrações de ADN muito baixas, no entanto, os erros associados a cada determinação podem ser elevados uma vez que as leituras de absorvância foram em alguns casos  $<0,010$ .

**Tabela 25** – Concentração e pureza (média  $\pm$  desvio padrão) do ADN dos extractos obtidos pelos métodos Wizard e CTAB a partir das amostras de óleos comerciais por análise nanofotométrica.

Amostras de Óleos Comerciais	Extracção por Wizard		Extracção por CTAB	
	Concentração	Pureza	Concentração	Pureza
	(ng/ $\mu$ L)	$A_{260}/A_{280}$	(ng/ $\mu$ L)	$A_{260}/A_{280}$
Óleo alimentar 1	5,90 $\pm$ 0,14	1,95 $\pm$ 0,07	1,93 <sup>a</sup> $\pm$ 0,11	- <sup>b</sup>
Óleo alimentar 2	7,15 $\pm$ 1,91	1,65 $\pm$ 0,34	2,78 $\pm$ 0,32	1,39 $\pm$ 0,21
Óleo alimentar 3	7,09 <sup>a</sup> $\pm$ 0,58	1,82 $\pm$ 0,07	2,88 $\pm$ 0,18	1,55 $\pm$ 0,07
Óleo alimentar 4	8,84 <sup>a</sup> $\pm$ 0,23	1,82 $\pm$ 0,03	3,10 $\pm$ 0,14	1,94 $\pm$ 0,09
Óleo alimentar 5	4,16 <sup>a</sup> $\pm$ 0,23	2,20 $\pm$ 0,66	5,70 $\pm$ 0,42	1,86 $\pm$ 0,21
Óleo de Soja 100% vegetal	11,75 <sup>a</sup> $\pm$ 2,47	1,56 $\pm$ 0,19	2,25 $\pm$ 0,35	2,05 $\pm$ 0,07
Óleo alimentar 7	4,83 <sup>a</sup> $\pm$ 0,46	1,74 $\pm$ 0,08	1,25 <sup>a</sup> $\pm$ 0,35	-
Óleo alimentar 8	4,95 <sup>a</sup> $\pm$ 0,08	1,88 $\pm$ 0,17	0,25 <sup>a</sup> $\pm$ 0,35	-

$A_{260}$  – absorvância a 260 nm,  $A_{280}$  – absorvância a 280 nm. <sup>a</sup> Valores resultantes de leituras de absorvâncias muito baixas ( $A_{260} < 0,010$ ). <sup>b</sup> Leituras da absorvância a 280 nm iguais a zero.

**Tabela 26** – Concentração, pureza e respectivos desvios padrão do ADN dos extractos obtidos pelos métodos Wizard<sup>®</sup> Magnetic e Nucleospin<sup>®</sup> food kit a partir das amostras de óleos comerciais por análise nanofotométrica.

Amostras de Óleos Comerciais	Extracção por Wizard <sup>®</sup> Magnetic		Extracção por Nucleospin <sup>®</sup>	
	Concentração	Pureza	Concentração	Pureza
	(ng/ $\mu$ L)	$A_{260}/A_{280}$	(ng/ $\mu$ L)	$A_{260}/A_{280}$
Óleo alimentar 1	14,25 $\pm$ 0,35	1,60 $\pm$ 0,06	3,38 $\pm$ 0,18	1,25 $\pm$ 0,07
Óleo alimentar 2	11,50 $\pm$ 0,71	1,95 $\pm$ 0,08	6,00 $\pm$ 2,12	1,65 $\pm$ 0,21
Óleo alimentar 3	11,10 $\pm$ 0,57	2,13 $\pm$ 0,25	1,50 <sup>a</sup> $\pm$ 0,00	1,21 $\pm$ 0,01
Óleo alimentar 4	11,28 $\pm$ 1,02	1,89 $\pm$ 0,16	3,65 $\pm$ 1,20	1,17 $\pm$ 0,18
Óleo alimentar 5	12,34 $\pm$ 0,94	1,81 $\pm$ 0,08	2,50 <sup>a</sup> $\pm$ 0,71	1,22 $\pm$ 0,16
Óleo de Soja 100% vegetal	12,40 $\pm$ 0,14	1,81 $\pm$ 0,16	4,75 $\pm$ 0,35	1,75 $\pm$ 0,07
Óleo alimentar 7	10,77 $\pm$ 0,33	1,62 $\pm$ 0,10	5,15 $\pm$ 0,49	1,75 $\pm$ 0,12
Óleo alimentar 8	12,75 $\pm$ 1,06	1,86 $\pm$ 0,09	1,88 <sup>a</sup> $\pm$ 0,18	1,09 $\pm$ 0,12

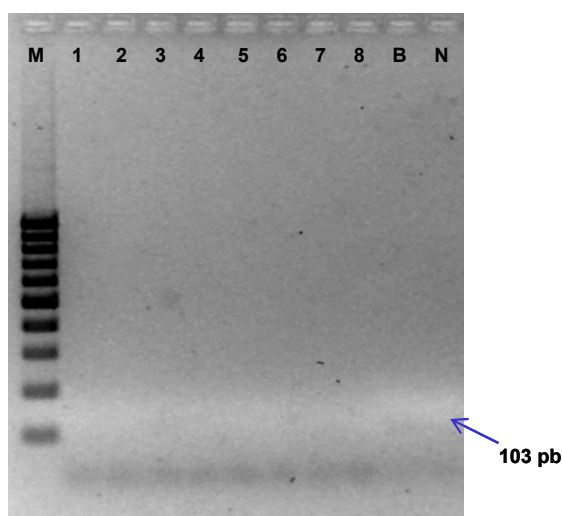
$A_{260}$  – absorvância a 260 nm,  $A_{280}$  – absorvância a 280 nm. <sup>a</sup> Valores resultantes de leituras de absorvâncias muito baixas ( $A_{260} < 0,010$ ).

## 2.9.2. PCR Qualitativa

Embora a análise espectrofotométrica dos extractos de ADN de óleos comerciais indique uma melhor adequabilidade do método Wizard<sup>®</sup> Magnetic, a

avaliação da capacidade do ADN presente nos extractos ser amplificado por PCR é que vai definir o melhor método. Para tal, procedeu-se à amplificação por PCR específica da lectina da soja, mas neste caso usando os *primers* LE1/LE2 (Tabela 12) por permitirem amplificar um fragmento de ADN mais pequeno (103 pb). De forma a aumentar a quantidade de ADN a ser amplificado, foram usados 4 µL de extracto em todas as amplificações por PCR no caso dos óleos.

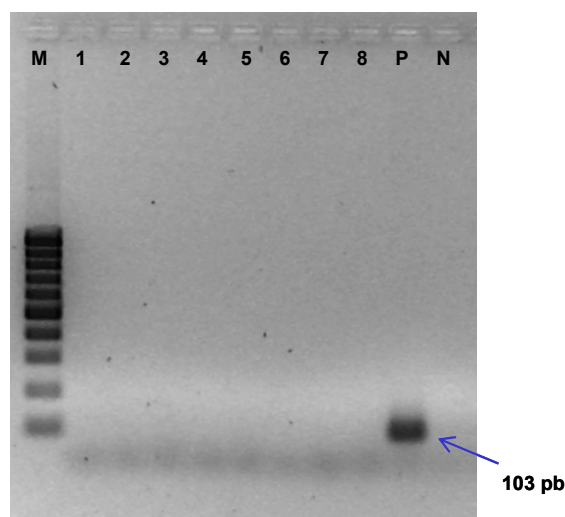
Os resultados da amplificação dos extractos utilizando os métodos Wizard (Figura 34) e Wizard® Magnetic (Figura 35) mostram que não permitiram a extracção de ADN amplificável uma vez que não se obteve qualquer produto de PCR. O método CTAB (Figura 36) permitiu a amplificação de ADN a partir de uma amostra de óleo 100% soja (linha 6) e uma amostra de óleo alimentar (linha 8), embora as bandas obtidas sejam muito fracas. O método Nucleospin® (Figura 37) foi, sem dúvida, o que permitiu a obtenção dos melhores resultados de amplificação por permitir a obtenção de produtos de PCR com o tamanho esperado em todas as amostras de óleos refinados.



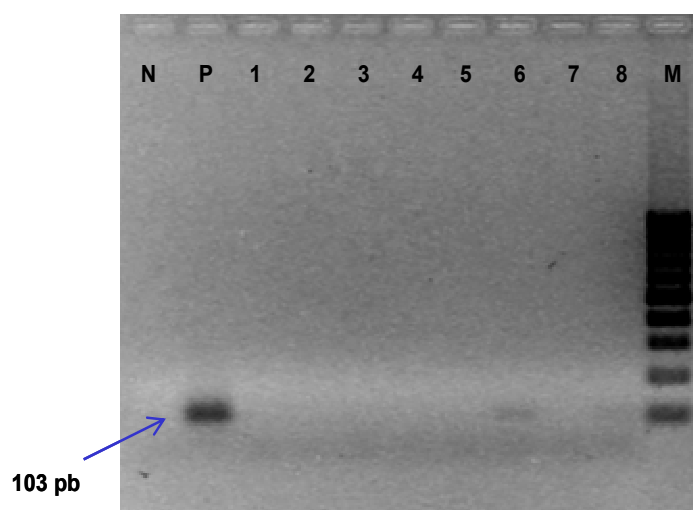
**Figura 34** – Electroforese em gel de agarose dos produtos de PCR resultantes da amplificação do gene da lectina da soja (*primers* LE1/LE2) de extractos provenientes de amostras comerciais de óleos obtidos pelo método Wizard: linhas 1-5 e 7-8 – óleos alimentares; linha 6 – óleo 100% soja; linha B – branco de extracção; linha N – controlo negativo, linha M – marcador de 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha).

É de notar que em todos os métodos de extracção se partiu da mesma quantidade de óleo refinado (200 g). De acordo com Hellebrand e colaboradores (1998), foi possível a extracção de ADN de óleos crus (não refinados) e óleos refinados, partindo de um volume de 200 mL de óleo colza. Desta forma, partiu-se de

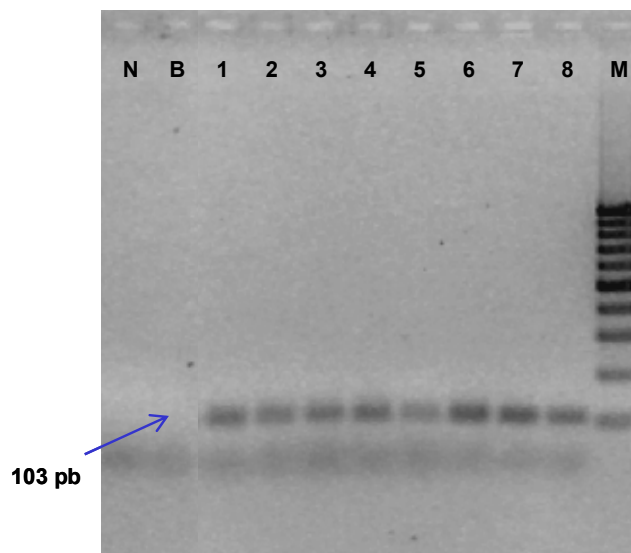
uma quantidade semelhante de óleo de soja refinado com o objectivo de se obterem extractos com ADN amplificável.



**Figura 35** – Electroforese em gel de agarose dos produtos de PCR resultantes da amplificação do gene da lectina da soja (*primers* LE1/LE2) dos extractos provenientes de amostras comerciais de óleos obtidos pelo método Wizard® Magnetic: linhas 1-5 e 7-8 – óleos alimentares; linha 6 – óleo 100% soja; linha P – controlo positivo; linha N – controlo negativo, linha M – marcador de 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha).



**Figura 36** – Electroforese em gel de agarose dos produtos de PCR resultantes da amplificação do gene da lectina da soja (*primers* LE1/LE2) dos extractos provenientes de amostras comerciais de óleos obtidos pelo método CTAB: linhas 1-5 e 7-8 – óleos alimentares; linha 6 – óleo 100% soja; linha P – controlo positivo; linha N – controlo negativo, linha M – marcador de 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha).

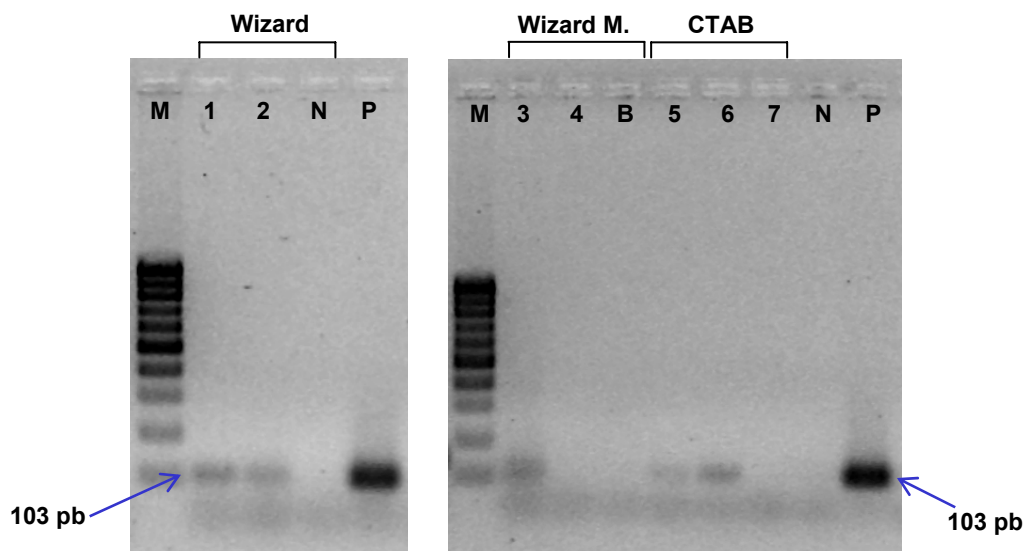


**Figura 37** – Electroforese em gel de agarose dos produtos de PCR resultantes da amplificação do gene da lectina da soja (*primers* LE1/LE2) dos extractos provenientes de amostras comerciais de óleos obtidos pelo método Nucleospin® food kit: linhas 1-5 e 7-8 – óleos alimentares; linha 6 – óleo 100% soja; linha B – branco de extracção; linha N – controlo negativo, linha M – marcador de 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha).

Estes resultados demonstraram que o Nucleospin® food kit pode ser usado com sucesso na extracção de ADN a partir de óleos refinados possibilitando a obtenção de ADN amplificável a partir deste tipo de matriz. Por outro lado, os métodos CTAB, Wizard e Wizard® Magnetic revelaram-se inadequados para este tipo de amostras, embora com o CTAB seja possível a obtenção fraca de fragmentos de PCR. Estes resultados representam um importante contributo para a detecção de ADN em óleos de soja, uma vez que este tipo de resultados não se apresenta descrito na literatura.

A análise comparativa dos métodos de extracção de ADN foi também efectuada utilizando a amostra de óleo de soja cru, isto é, não sujeito ao processo de refinação, dado que a literatura descreve a possibilidade de extracção de ADN amplificável a partir de óleos não refinados (Gryson et al., 2002; Gryson et al., 2004; Pauli et al., 1998). Assim, a amostra de óleo cru foi sujeita à extracção de ADN a partir de diferentes quantidades de amostra. Procedeu-se à extracção pelos métodos Wizard, Wizard® Magnetic e CTAB, para a optimização da quantidade de óleo cru, de forma a obter amplificação positiva por PCR. Os extractos testados foram obtidos a partir de 32 e 50 g de óleo cru, incluindo também extractos de óleo neutralizado. Verifica-se que com os 3 métodos utilizados foi possível obter ADN amplificável a partir de 50 g de óleo cru e, mesmo com 32 g com o Wizard e CTAB (Figura 38). No entanto, quando o óleo passa pela primeira etapa de refinação que consiste na

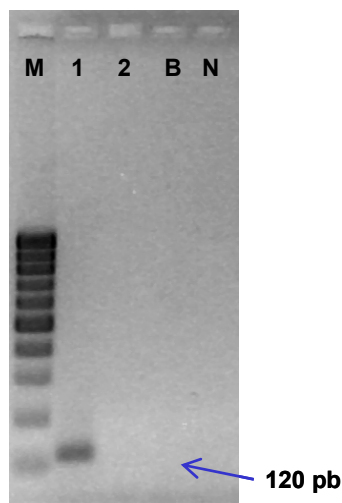
acidificação e neutralização, já não se obteve ADN amplificável com os métodos, Wizard® Magnetic e CTAB (Figura 38), mesmo usando 160 g de óleo no caso do Wizard® Magnetic, recomendado pelo fabricante do kit de extracção.



**Figura 38** – Electroforese em gel de agarose dos produtos de PCR resultantes da amplificação do gene da lectina da soja (*primers* LE1/LE2) dos extractos provenientes das etapas de produção do óleo de soja, cru e neutralizado, extraídas a partir de diferentes quantidades de óleos pelos métodos: Wizard (linhas 1-2); Wizard® Magnetic (linhas 3-4, B) e CTAB (linhas 5-7); linhas 1, 3 e 5 – óleo cru (50 g); linhas 2 e 6 – óleo cru (32 g); linhas 4 e 7 – óleo neutralizado (160 g); linha B – branco de extracção; linha N – controlo negativo, linha P – controlo positivo; linha M – marcador 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha).

Este resultado já era esperado uma vez que nos óleos refinados anteriormente testados 200 g de óleo não foram suficientes para gerar um resultado positivo com este kit de extracção. Estes dados provam que grande parte do ADN que existia no óleo cru, foi removido e/ou degradado durante a etapa de acidificação e neutralização do óleo, tal como sugerido por outros autores (Gryson et al., 2004; Gryson et al., 2002).

Por outro lado, o uso de um conjunto de *primers* que originam fragmentos de ADN maiores (120 pb), também só permitiu um resultado positivo para o extracto de óleo de soja cru, o que apoia o facto de cada etapa da refinação facilitar a fragmentação do ADN (Figura 39). Isto já era esperado para o extracto de óleo neutralizado dado que, com *primers* de tamanho inferior, também não se obteve resultado positivo.

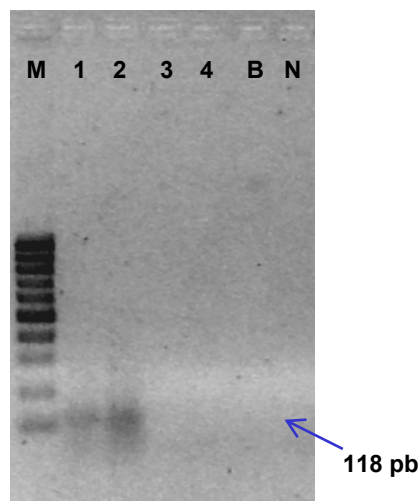


**Figura 39** – Electroforese em gel de agarose dos produtos de PCR resultantes da amplificação do gene da lectina da soja (*primers* LE3/LE4) provenientes das primeiras etapas da refinação do óleo de soja extraídas pelo método Nucleospin® food kit: linha 1 – óleo cru; linha 2 – óleo neutralizado; linha B – branco de extracção; linha N – controlo negativo; linha M – marcador 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha).

De seguida, testou-se a alteração de uma das variáveis da PCR, o volume de extracto usado em cada amplificação. Assim, recorrendo aos extractos já anteriormente testados realizou-se uma nova reacção de amplificação com diferentes volumes de extracto usado. A PCR foi realizada na presença dos *primers* GM03/GM04 que amplificam fragmentos da lectina da soja com 118 pb. A Figura 40 revelou a amplificação de ADN a partir de amostras de óleo cru (linhas 1 e 2) utilizando-se diferentes volumes de extracto (2 e 4 µL). O uso de 4 µL de extracto de ADN no óleo cru aumentou a quantidade de ADN amplificado, pela maior intensidade da banda, embora difusa. Por outro lado, utilizando-se as mesmas condições para o extracto do óleo neutralizado não se obteve amplificação com nenhum dos volumes de extracto testados na PCR.

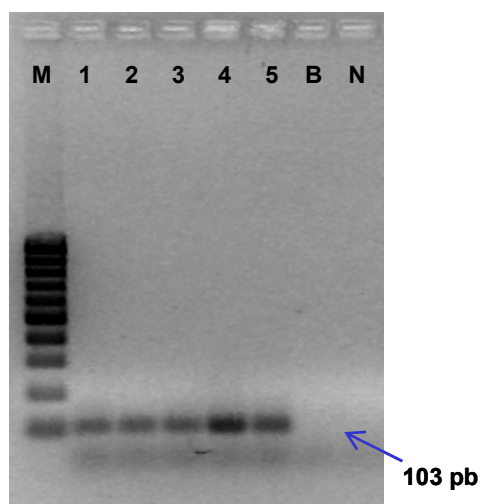
De acordo com todos os dados verificados e após optimização do método Nucleospin® food kit para a extracção de ADN a partir de óleos refinados, procedeu-se à extracção do ADN a partir das etapas de refinação do óleo de soja utilizando-se esta técnica. Assim, tal como efectuado para os óleos comerciais, amplificaram-se os extractos utilizando *primers* (LE1/LE2) para o gene da lectina que levam à produção de fragmentos de ADN mais pequenos, aumentando a probabilidade de amplificar ADN degradado durante a refinação do óleo.





**Figura 40** – Electroforese em gel de agarose dos produtos de PCR resultantes da amplificação do gene da lectina da soja (*primers* GM03/GM04) a partir de 2 e 4  $\mu$ L de extractos de ADN provenientes das primeiras etapas da refinação do óleo de soja obtidos pelo método Wizard: linha 1 – óleo cru (2  $\mu$ L); linha 2 – óleo cru (4  $\mu$ L); linha 3 – óleo neutralizado (2  $\mu$ L); linha 4 – óleo neutralizado (4  $\mu$ L); linha B – branco de extracção; linha N – controlo negativo; linha M – marcador 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha).

Os resultados da amplificação dos extractos obtidos com o método Nucleospin<sup>®</sup> aplicado a todas as etapas de refinação do óleo de soja originaram fragmentos de 103 pb com uma intensidade considerável, conforme se pode observar na Figura 41. Estes resultados foram concordantes com os anteriormente obtidos para os óleos processados (Figura 37), reforçando a possibilidade de, com as técnicas utilizadas neste trabalho, ser possível a obtenção de ADN amplificável de óleos refinados.

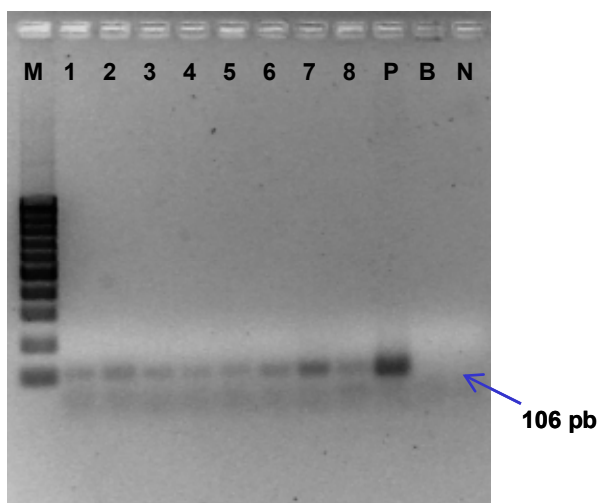


**Figura 41** – Electroforese em gel de agarose dos produtos de PCR resultantes da amplificação do gene da lectina da soja (*primers* LE1/LE2) provenientes de extractos das etapas de refinação do óleo de soja obtidos pelo método Nucleospin<sup>®</sup> food kit: linha 1 – óleo cru; linha 2 – óleo neutralizado; linha 3 – óleo lavado; linha 4 – óleo branqueado; linha 5 – óleo desodorizado; linha B – branco de extracção; linha N – controlo negativo; linha M – marcador 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha).

Verifica-se que a maior intensidade foi obtida na banda da linha 4 (Figura 41), correspondente ao extracto de óleo branqueado, o qual está concordante com a maior concentração de ADN do respectivo extracto (32,5 ng/μL). Verificou-se também que com extractos de apenas 5 ng/μL de ADN é possível obter produtos de PCR.

Desde o óleo neutralizado, passando pela etapa da lavagem (adição de água a 80°C para remoção dos sabões e o excesso de soda), ao óleo branqueado (adsorção dos pigmentos e metais ao carvão e terras activadas), até ao óleo desodorizado (remoção de sabores e odores sob vácuo, durante 2h a 240°C), e pronto a ser embalado, foi possível a detecção de ADN de soja. Este facto contradiz a literatura, que refere que, após a neutralização não é possível obter ADN (Gryson et al., 2002).

Tendo os resultados para a detecção da lectina da soja sido positivos, passou-se para a fase seguinte que consistiu na detecção da soja RR nos óleos refinados. Para tal, utilizaram-se *primers* (RRS-3J1/RRS-3J3) (Tabela 12) específicos do evento em análise, de forma a produzirem um fragmento pequeno (106 pb), e deste modo possibilitar a detecção de ADN degradado, tal como para a detecção da lectina em óleos. A Figura 42 evidenciou a presença de ADN de soja RR em todas as amostras de óleos comerciais extraídos com o método Nucleospin®, ainda que apresentando bandas pouco intensas. O extracto correspondente à amostra da linha 7 mostrou uma banda um pouco mais intensa quando comparada com as restantes amostras testadas.



**Figura 42** – Electroforese em gel de agarose dos produtos de PCR resultantes da amplificação específica do evento da soja RR (*primers* RRS-3J1/RRS-3J3) provenientes de extractos de amostras comerciais de óleos extraídas pelo método Nucleospin® food kit: linhas 1-5 e 7-8 – óleos alimentares; linha 6 – óleo 100% soja; linha P – controlo positivo (material de referência certificado com 0,5% de soja RR); linha B – branco de extracção; linha N – controlo negativo, linha M – marcador de 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha).

Estes resultados evidenciaram a presença de material GM em todas os extractos testados, confirmado assim a utilização de sementes de soja GM nos óleos alimentares e no óleo de soja 100% vegetal. Todos os extractos apresentaram bandas de menor intensidade do que a banda do padrão de soja contendo 0,5% de soja RR. No entanto, não se pode com isto inferir que a percentagem de material GM seja inferior a 0,5%. Apenas se poderá verificar tal por análise por PCR em tempo real. De referir que, alguns dos óleos comerciais analisados continham explicitamente no rótulo a informação “produzidos a partir de sementes GM” (Figura 43), podendo-se concluir que estas marcas pretendem salvaguardar a presença de soja GM no produto final.

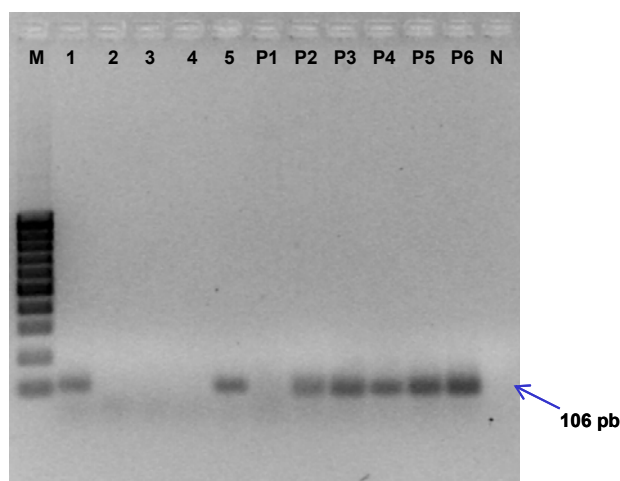


Figura 43 – Exemplo de alguns rótulos de amostras de óleos comerciais.

Dado que foi possível a detecção de material GM em amostras de óleos comerciais, procedeu-se à detecção de ADN geneticamente modificado a partir dos extractos provenientes dos óleos das etapas de refinação do óleo de soja. De acordo com a informação cedida pela empresa produtora do óleo de soja, as amostras fornecidas para as análises estavam classificadas como sendo produzidas a partir de grãos GM. Esta informação foi já claramente comprovada, através das análises efectuadas às farinhas resultantes das etapas preparativas para a extracção do óleo de soja por PCR qualitativa (Figura 27).

A amplificação da soja RR nos óleos das etapas de refinação foi também efectuada por utilização dos *primers* RRS-3J1/RRS-3J3, tal como para as amostras de óleos refinados. Por análise dos fragmentos obtidos após electroforese, verifica-se que apenas se consegue obter ADN proveniente de soja RR a partir do óleo cru e no óleo final desodorizado (linhas 1 e 5, Figura 44). Ao contrário do que era esperado, as amostras das etapas intermédias (neutralização, lavagem e branqueamento) não amplificaram. Pensa-se que este facto se deva a uma possível degradação do ADN

durante o tempo de armazenamento das amostras. Estas etapas são consideradas provenientes de fases intermédias não estabilizadas devido às condições a que foram sujeitas durante o processo de refinação, pelo que, embora seja possível a amplificação de ADN do gene da lectina nestas fases, o mesmo não aconteceu com a amplificação específica da soja RR.



**Figura 44** – Electroforese em gel de agarose dos produtos de PCR resultantes da amplificação específica do evento da soja RR (*primers* RRS-3J1/RRS-3J3) provenientes de extractos das etapas de refinação do óleo de soja extraídas pelo método Nucleospin® food kit: linha 1 – óleo cru; linha 2 – óleo neutralizado; linha 3 – óleo lavado; linha 4 – óleo branqueado; linha 5 – óleo desodorizado; linhas P1 a P6 – materiais de referência certificados com soja RR 0, 0,1, 0,5, 1, 2 e 5%, respectivamente; linha N – controlo negativo; linha M – marcador 100 pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha).

Atendendo a que se verificou a amplificação de material GM na última etapa da produção do óleo de soja (desodorização), parece evidente que o ADN permaneceu em quantidades mensuráveis até esta fase. Este facto reforça a ideia de que, ao longo da refinação, o ADN não é completamente removido. A ausência deste, nas fases intermédias, pode ser justificada pela instabilidade de conservação das amostras dos óleos. Este pormenor poderá resultar da degradação do ADN entre o momento da recolha das amostras da linha de produção e o momento em que foram analisadas.

### 2.9.3. PCR em Tempo Real

De forma idêntica ao efectuado para as amostras provenientes de grãos de soja, amplificaram-se os extractos dos óleos resultantes dos processos de extracção e refinação, por PCR em tempo real, para confirmar os resultados anteriores obtidos na PCR qualitativa e para quantificar a soja RR. Deste modo, procedeu-se à preparação

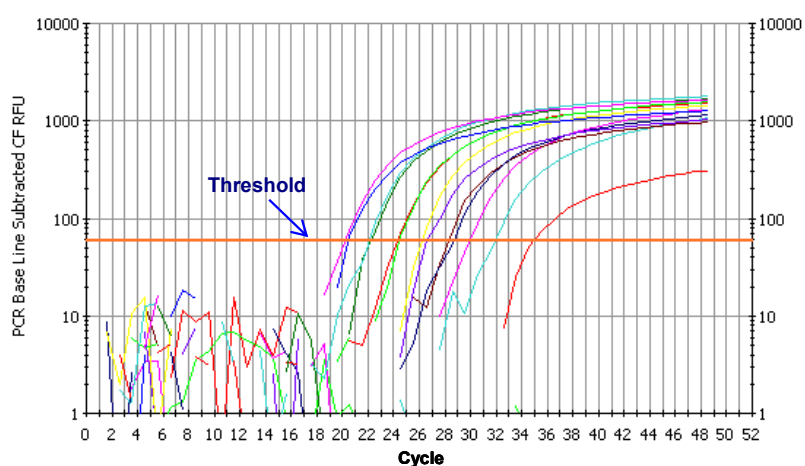
das curvas de calibração para o gene da lectina e para a soja RR. Como efectuado para as amostras de grãos de soja, procedeu-se à diluição seriada de um extracto de material de referência certificado com 5% de soja RR, cujas concentrações foram adaptadas às baixas concentrações de ADN dos extractos de amostras de óleos a quantificar (Tabela 27).

**Tabela 27** – Dados sobre as concentrações de ADN, nº de cópias de ADN usadas e valores de Ct obtidos por amplificação por PCR em tempo real (média  $\pm$  desvio padrão) para a lectina da soja e soja RR, utilizando padrões de ADN.

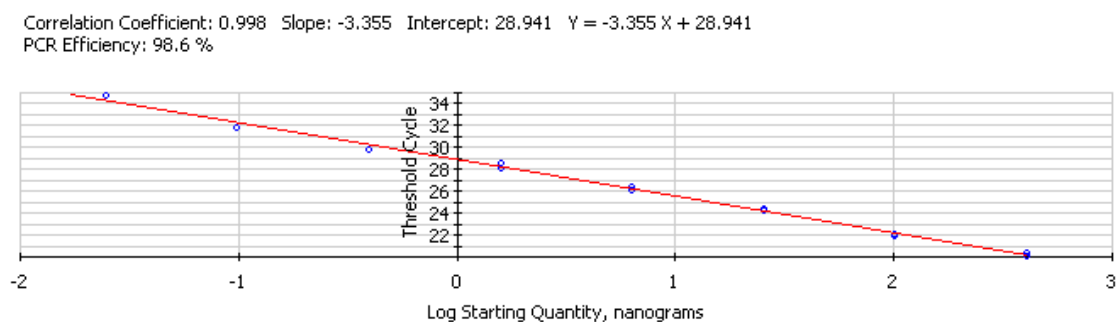
Padrões de Soja (ng/ $\mu$ L)	Lectina		RR	
	Número de cópias	Ct	Número de cópias	Ct
100,0	353982,3	20,29 $\pm$ 0,17	17699,1	24,94 $\pm$ 0,24
33,33	88495,6	22,06 $\pm$ 0,11	4424,8	27,28 $\pm$ 0,17
11,11	22123,9	24,34 $\pm$ 0,10	1106,2	30,12 $\pm$ 0,05
3,704	5531,0	26,35 $\pm$ 0,30	277,0	30,85 $\pm$ 0,20
1,235	1380,5	28,40 $\pm$ 0,32		ND
0,4115	346,0	29,89 $\pm$ 0,25		ND
0,1372	86,5	31,84 $\pm$ 0,21	4,3	37,15 $\pm$ 0,30
0,0457	21,6	34,87 $\pm$ 0,27		ND

ND – amplificação não detectada; Ct – Cycle threshold

Nas Figura 45 e 46 apresentam-se, respectivamente, as curvas de fluorescência em função do número de ciclos da PCR em tempo real e curva de calibração para a lectina da soja.

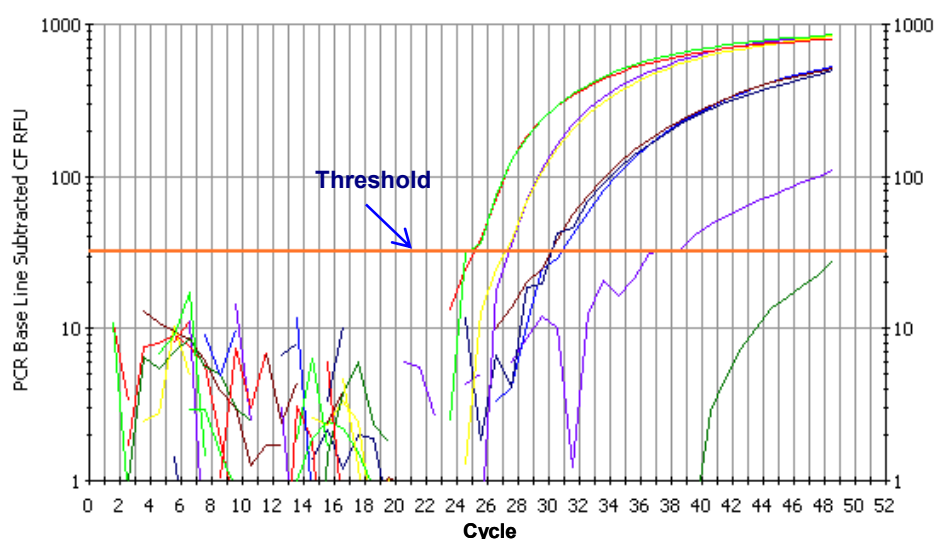


**Figura 45** – Gráfico da função logarítmica da fluorescência em função do número de ciclos de PCR em tempo real por amplificação do gene da lectina e utilização de sondas de hidrólise do tipo TaqMan<sup>TM</sup>.

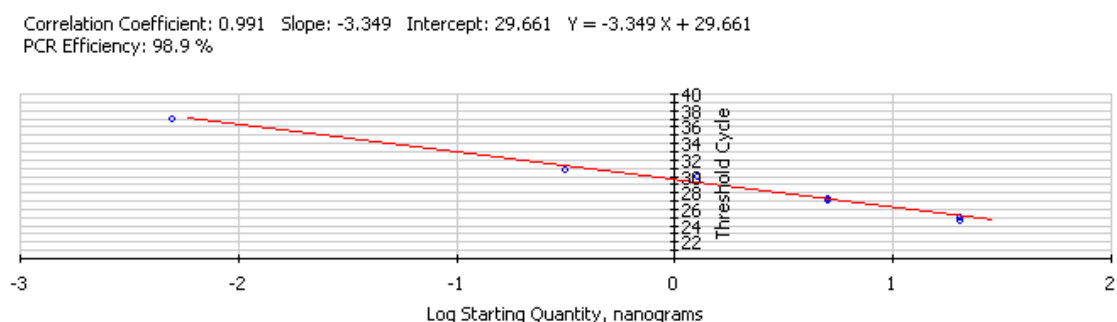


**Figura 46** – Curva de calibração da quantidade de ADN de soja amplificado por PCR em tempo real para o gene da lectina em função do Ct.

A amplificação específica dos padrões para a soja RR foi efectuada paralelamente ao gene da lectina, cujas curvas de fluorescência e calibração se apresentam nas Figura 47 e 48, respectivamente.



**Figura 47** – Gráfico da função logarítmica da fluorescência em função do número de ciclos de PCR em tempo real por amplificação da soja RR e utilização de sondas de hidrólise do tipo TaqMan<sup>TM</sup>.



**Figura 48** – Curva de calibração da quantidade de ADN de soja amplificado por PCR em tempo real para a soja RR em função do Ct.

Por análise das 2 curvas de calibração (Figura 46 e 48), verifica-se que os valores de Ct se correlacionam bem com o logaritmo da quantidade de ADN tanto para a lectina como para a soja RR, uma vez que o  $r^2 > 0,99$ , apesar de haver alguns padrões que não amplificaram para a soja RR. As eficiências para ambas as curvas foram próximas de 100%, o que significa que as condições foram adequadas para a quantificação de ADN. Por interpolação às curvas obtidas (Figura 46 e 48), quantificou-se o ADN das amostras correspondentes às etapas de extracção (óleo cru) e refinação (óleo neutralizado, lavado, branqueado e desodorizado) do óleo de soja. Verificou-se que todas as amostras testadas se encontravam dentro dos limites estabelecidos pelos padrões de soja considerados para a curva de calibração da lectina, possibilitando a quantificação do ADN presente nestas amostras (Tabela 28). Estes resultados foram concordantes com a amplificação obtida na PCR qualitativa, confirmando deste modo, a presença de ADN ao longo da refinação do óleo de soja. A amostra que revelou maior quantidade de ADN em 4  $\mu$ L de extracto foi o óleo cru, sendo este facto já esperado, uma vez que este óleo não passou pelo processo de refinação. Desta forma, foi possível detectar ADN em todas as etapas de refinação a partir de extractos obtidos pelo método Nucleospin® food kit.

**Tabela 28** – Resultados obtidos por PCR em tempo real (média  $\pm$  desvio padrão), relativos à amplificação do gene da lectina da soja para as amostras das etapas de extracção (óleo cru) e refinação do óleo.

Amostras de óleo de soja	Lectina		
	Ct	Quantidade de ADN (ng)	Número de cópias de ADN
Cru	25,76 $\pm$ 0,32	9,00 $\pm$ 1,96	7967,6
Neutralizado	29,96 $\pm$ 0,47	0,51 $\pm$ 0,16	454,0
Lavado	31,74 $\pm$ 0,26	0,15 $\pm$ 0,03	131,4
Branqueado	29,86 $\pm$ 0,04	0,53 $\pm$ 0,01	471,7
Desodorizado	27,56 $\pm$ 0,05	2,30 $\pm$ 0,51	2035,4
Padrão de validação 1% GM	20,85 $\pm$ 0,09	259,2 $\pm$ 16,3	229331,9

Ct – Cycle threshold

Em alguns estudos, a detecção de ADN em óleos é obtida até à fase da neutralização (Gryson et al., 2004). Dependendo do tipo de tratamento alcalino a que o óleo é submetido, o ADN pode ficar retido em reduzidas quantidades, por adsorção às moléculas dos fosfolípidos. A utilização de 250 g de óleo neutralizado permitiu a detecção positiva de ADN, no extracto obtido por Gryson e colaboradores (2004). De relembrar que, neste trabalho, os extractos de ADN obtidos a partir do óleo

neutralizado, lavado, branqueado e desodorizado, partiram de um volume inicial de 200 g de óleo. Mais uma vez os resultados obtidos pela análise de PCR qualitativa foram confirmados por PCR em tempo real.

Apesar da quantidade de ADN amplificado nos extractos de óleo cru e desodorizado estar dentro dos limites de quantificação da recta de calibração, a percentagem estimada para estas amostras pode conter possíveis desacertos de quantificação devido à baixa concentração de ADN amplificado, pelo que devem ser encarados apenas como uma nota informativa acerca do teor em material GM.

Os resultados da quantificação da soja RR nas etapas de refinação apresentam-se na Tabela 29, onde se pode confirmar a presença de soja RR em todas as etapas, excepto no óleo lavado e branqueado. Nos óleos cru e neutralizado foi possível obter uma estimativa de %OGM da ordem de grandeza obtida para os respectivos grãos (50%), o que significa concordância de resultados. Nas etapas intermédias, os resultados foram também concordantes com a análise por PCR qualitativa, uma vez que não foi detectada soja RR nos óleos, lavado e branqueado, e no óleo neutralizado o nível de amplificação foi abaixo do limite de quantificação (Tabela 29).

**Tabela 29** – Resultados da PCR em tempo real (média  $\pm$  desvio padrão) relativos à amplificação da soja RR para as amostras das etapas de extracção (óleo cru) e refinação do óleo.

Amostras de óleo de soja	Ct	Soja RR		
		Quantidade de ADN (ng)	Número de cópias de ADN	% de ADN GM
Cru	26,78 $\pm$ 0,59	7,55 $\pm$ 2,98	6681,4	83,9
Neutralizado	37,54 $\pm$ 0,66	NQ <sup>a</sup>	-	-
Lavado		ND		
Branqueado		ND		
Desodorizado	29,59 $\pm$ 1,33	1,41 $\pm$ 1,36	1249,0	61,4
Padrão de validação 1% GM	28,30 $\pm$ 0,07	2,55 $\pm$ 0,13	2256,6	0,98

ND – amplificação não detectada; <sup>a</sup> Não quantificado por estar abaixo do limite de quantificação.

Perante os resultados obtidos na PCR em tempo real para todas as etapas de refinação do óleo de soja, procedeu-se à quantificação do ADN presente nas amostras de óleos comerciais extraídos pelo método Nucleospin<sup>®</sup> food kit. As reacções para a PCR em tempo real foram realizadas nas mesmas condições que a PCR efectuada para as amostras das etapas de refinação do óleo (Tabela 30). A quantificação do



ADN presente nos extractos dos óleos comerciais foi efectuada por interpolação à curva de calibração obtida para a reacção da amplificação da lectina ( $y = -3,208 x + 32,868$ ;  $r^2=0,994$  e eficiência de 105,0%). A amplificação específica da soja RR presente nos óleos permite a confirmação de amplificações anteriores e, por interpolação à curva de calibração ( $y = -3,421 x + 34,914$ ;  $r^2=0,996$  e eficiência de 96,0%), obter uma estimativa da %OGM nas amostras.

**Tabela 30** – Concentrações de ADN, nº de cópias de ADN usadas e valores de Ct obtidos por amplificação por PCR em tempo real (média ± desvio padrão) para a lectina da soja e soja RR, utilizando padrões de ADN.

Padrões de Soja (ng/μL)	Lectina		RR	
	Número de cópias	Ct	Número de cópias	Ct
100,0	353982,3	24,70 ± 0,35	17699,1	30,66 ± 0,09
33,33	117699,1	25,98 ± 0,30	5902,7	31,89 ± 0,11
11,11	39292,0	27,20 ± 0,22	1964,6	33,75 ± 0,39
3,704	13097,3	29,04 ± 0,42	655,8	35,00 ± 0,20
1,235	4371,7	30,93 ± 0,21	218,6	37,20 ± 0,35
0,4115	1460,2	32,04 ± 0,25	72,8	38,74 ± 0,11
0,1372	485,8	34,29 ± 0,15		ND
0,0457	161,9	34,77 ± 0,21		ND

ND – amplificação não detectada.

Das 8 amostras de óleos testadas (Tabela 31), apenas 2 (amostras 4 e 5), não amplificaram o gene da lectina, embora as 6 amostras positivas para a lectina tenham apresentado uma quantidade de ADN abaixo do limite de quantificação imposto para esta reacção (Tabela 30). No entanto, é de referir que, estes resultados da análise quantitativa confirmaram os resultados positivos anteriormente obtidos por análise qualitativa (Figura 37).

A amplificação específica da soja RR efectuada em paralelo com a detecção da lectina da soja nas amostras de óleos comerciais permitiu a detecção de soja RR em 5 das 8 amostras testadas (Tabela 32). Nesta reacção apenas as amostras 1, 2 e 3 não amplificaram.

Por outro lado, as amostras 4 e 5, que não haviam amplificado na reacção da lectina, apresentaram valores positivos de amplificação do ADN GM. De facto, não era esperada, a amplificação específica RR da soja para estas amostras, uma vez que, as mesmas não haviam amplificado o gene da lectina, pelo que poderá ter ocorrido algum

factor não identificado durante a reacção de amplificação da lectina que tenham condicionado o desempenho destas 2 amostras. De lembrar que pelos dados da análise de PCR qualitativa, todas as amostras amplificaram em presença dos *primers* da lectina (Figura 37).

**Tabela 31** – Resultados da PCR em tempo real (média  $\pm$  desvio padrão) relativos à amplificação do gene da lectina da soja para as amostras de óleos vegetais comerciais.

Amostras de óleos comerciais	Ct	Lectina	
		Quantidade de ADN (ng)	Número de cópias de ADN
Óleo alimentar 1	36,90 $\pm$ 0,15	0,0557 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0059	49,3
Óleo alimentar 2	36,77 $\pm$ 0,12	0,0609 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0052	53,9
Óleo alimentar 3	37,43 $\pm$ 0,58	0,0396 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0161	35,0
Óleo alimentar 4		ND	
Óleo alimentar 5		ND	
Óleo 100% soja 6	38,08 $\pm$ 0,14	0,0237 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0025	21,0
Óleo alimentar 7	37,56 $\pm$ 0,15	0,0348 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0036	30,8
Óleo alimentar 8	42,34 $\pm$ 0,08	0,0011 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0001	1,0
Padrão de validação 1% GM	26,13 $\pm$ 0,15	127,0 $\pm$ 14,1	112389,4

ND – amplificação não detectada; <sup>a</sup> abaixo do limite de quantificação.

**Tabela 32** – Resultados da PCR em tempo real (média  $\pm$  desvio padrão) relativos à amplificação da soja RR para as amostras de óleos vegetais comerciais.

Amostras de óleo comerciais	Ct	RR		
		Quantidade de ADN (pg)	Número de cópias de ADN	% de ADN GM
Óleo alimentar 1		ND		
Óleo alimentar 2		ND		
Óleo alimentar 3		ND		
Óleo alimentar 4	42,72 $\pm$ 0,11	5,3 <sup>a</sup> $\pm$ 0,4	4,6	- <sup>c</sup>
Óleo alimentar 5	42,67 $\pm$ 0,09	5,6 <sup>a</sup> $\pm$ 0,3	5,0	- <sup>c</sup>
Óleo 100% soja	43,36 $\pm$ 0,40	3,5 <sup>a</sup> $\pm$ 0,9	3,1	14,6
Óleo alimentar 7	43,57 $\pm$ 0,32	3,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,6	2,6	8,61
Óleo alimentar 8	44,05 $\pm$ 0,07	2,1 <sup>a</sup> $\pm$ 0,1	1,9	- <sup>b</sup>
Padrão de validação 1% GM	34,51 $\pm$ 0,10	1,31 $\pm$ 0,09 <sup>d</sup>	1161,9	1,03

ND – amplificação não detectada; <sup>a</sup> Abaixo do limite de quantificação; <sup>b</sup> valor sem significado devido à baixa amplificação do gene da lectina; <sup>c</sup> amplificação do gene da lectina não detectada; <sup>d</sup> valor em ng.

Os valores de percentagem de OGM apresentados para as amostras 7 e 8 são apenas uma estimativa do teor em soja RR presente nas amostras testadas, dado que as quantidades de ADN presentes nas amostras foram muito baixas, sendo por isso afectadas por erros elevados na quantificação. No entanto, não deixam de ser relevantes pelo contributo que possam trazer.

Na Tabela 33 apresenta-se o resumo comparativo dos dados das análises de PCR qualitativas e PCR em tempo real para todas as amostras das etapas de extracção e refinação do óleo de soja, assim como para os óleos comerciais analisados.

**Tabela 33** – Comparação dos resultados obtidos por PCR qualitativa e PCR em tempo real.

Amostras Testadas		PCR Qualitativa		PCR em tempo real	
		Lectina	RR	Lectina	RR
Etapas de Preparação, Extracção e Refinação do óleo de soja	Grão Inteiro	+++	+++	+++	+++
	Grão Partido	+++	+++	+++	+++
	Grão Laminado	+++	+++	+++	+++
	Grão Extrudido	+++	+++	+++	+++
	Farinha (subproduto)	+++	+++	+++	+++
	Óleo Cru	++	++	++	++
	Óleo Neutralizado	++	-	+	+
	Óleo Lavado	++	-	+	-
	Óleo Branqueado	++	-	+	-
	Óleo Desodorizado	++	++	++	+
Óleos Comerciais	Óleo alimentar 1	+	+	+	-
	Óleo alimentar 2	+	+	+	-
	Óleo alimentar 3	+	+	+	-
	Óleo alimentar 4	+	+	-	+
	Óleo alimentar 5	+	+	-	+
	Óleo 100% soja	+	+	+	+
	Óleo alimentar 7	+	+	+	+
	Óleo alimentar 8	+	+	+	+

+++ amplificação forte; ++ amplificação média; + amplificação fraca; - sem amplificação

A detecção e quantificação do ADN a partir de matrizes provenientes de grãos de soja levaram, em geral, à produção de elevadas quantidades de produtos de PCR, tanto para a lectina da soja, como para a soja RR, dados esses já vastamente

explorados e comprovados em vários estudos referidos ao longo deste trabalho (Gryson et al., 2008; Mafra et al., 2008a).

No entanto, a detecção e quantificação de ADN proveniente de óleos refinados foi uma tarefa difícil de alcançar, como seria de prever de acordo com estudos sem sucesso descritos na literatura (Gryson et al., 2002; Gryson et al., 2004). Sendo o ADN difícil de se obter a partir de óleos refinados, a optimização e escolha do método de extracção foi um ponto crítico deste trabalho. Assim, conclui-se que o protocolo de extracção com o kit Nucleospin® for food a partir de 200 g de óleo permitiu a obtenção de ADN amplificável. A sua detecção foi conseguida por PCR qualitativa e comprovada por PCR em tempo real, embora algumas das amostras tenham evidenciado baixos níveis de amplificação. Desta forma, pode concluir-se que é possível a extracção e amplificação do ADN a partir de óleos refinados. A utilização de *primers* que levaram à produção de fragmentos de ADN mais pequenos do que os usualmente descritos na literatura (Querci et al., 2006) terá também contribuído para a detecção de ADN degradado com sucesso. Estes resultados contribuem de uma forma inovadora para o desenvolvimento de metodologias para a avaliação e rastreabilidade de óleos vegetais quanto à presença de OGM. No entanto, ficou também claro que há ainda um longo caminho a percorrer para tentar explicar algumas discrepâncias evidenciadas.

---

# CONCLUSÃO



# CONCLUSÃO

---

Ao longo deste estudo foram avaliadas duas grandes áreas de interesse que contribuíram para a caracterização do óleo de soja produzido a partir de sementes GM. Uma das áreas centrou-se na caracterização química, a qual revelou que as sementes GM têm uma composição semelhante às convencionais, no que diz respeito aos seguintes parâmetros avaliados: humidade, proteínas, cinzas, hidratos de carbono, gordura total, acidez, ácidos gordos, tocoferóis e fitosteróis.

Da determinação da gordura total, verificou-se que as etapas de preparação para a extracção do óleo de soja são determinantes para maximização do rendimento do processo, dado que o teor em gordura disponível para extracção vai aumentando ao longo das etapas. O controlo da humidade e a limpeza no início do processo de extracção, assim como, a clivagem, a laminagem e a expansão das sementes contribuíram para uma optimização do teor de óleo extraído.

O teor em ácidos gordos manteve-se aproximadamente constante ao longo de todas as etapas de produção do óleo de soja, tendo-se apenas verificado um aumento no teor em isómeros *trans* dos ácidos gordos insaturados na última etapa da refinação. A elevada temperatura a que o óleo é sujeito nesta etapa, constitui um motivo provável, para a ocorrência deste facto. Os ácidos linoleico ( $\omega-6$ ) e oleico ( $\omega-9$ ), representam as principais classes de ácidos gordos presentes neste óleo.

A determinação do teor em tocoferóis revelou que o uso de sementes GM não alterou o teor de vitamina E esperado, dado que os valores determinados se encontravam dentro dos parâmetros definidos para sementes convencionais. Ao longo da refinação do óleo de soja verificou-se uma diminuição em cerca de 30% no teor de tocoferóis totais, em contraste com os 47% de redução descritos por outros autores (Verleyen et al., 2002), sendo a desgomagem/neutralização e a desodorização, as etapas com maior contribuição na diminuição dos teores em vitamina E.

Da análise dos fitosteróis, concluiu-se que apenas 20% do total de fitosteróis foram eliminados ao longo das etapas de refinação do óleo de soja. Estes dados, juntamente com os resultados obtidos na análise dos tocoferóis, parecem corroborar com o facto das recentes técnicas de refinação favorecerem a retenção de compostos de interesse, o que contribui para responder à crescente demanda de produtos mais saudáveis por parte do consumidor, em geral.

A avaliação química permitiu concluir que as sementes de soja GM apresentam um perfil químico semelhante às sementes convencionais. Este facto era o esperado,

dado que as sementes de soja com o evento GTS-40-3-2 (Roundup Ready®) foram desenvolvidas tendo em vista apenas a tolerância ao herbicida, pelo que, o seu perfil químico não deverá ser alterado em resultado desta manipulação genética.

A outra área de interesse estudada neste trabalho consistiu na detecção de ADN em óleo de soja, com especial ênfase para os efeitos da extracção e refinação e análise de amostras comerciais de óleos refinados. Dada a escassez de trabalhos descritos na literatura relacionados com a detecção de ADN em óleos refinados e dado o interesse na detecção e rastreabilidade de OGM em alimentos por imposições da legislação da UE, verificou-se que este trabalho contribuiu com avanços consideráveis nesta área.

Durante as etapas preparativas para a extracção do óleo, incluindo respectivo subproduto, confirmou-se a detecção de ADN específico da espécie por amplificação do gene da lectina da soja. Foi também possível verificar, através da PCR específica da soja RR, que as sementes usadas para a produção de óleo de soja eram GM, conforme a informação fornecida sobre o lote industrial estudado. Para comparação, foram também incluídas no estudo sementes fornecidas pela mesma indústria, rotuladas como não OGM. Verificou-se a ausência de material transgénico apenas numa amostra proveniente de um lote mais antigo, enquanto as amostras mais recentes estavam contaminadas. Este facto permite comprovar a existência de contaminação tecnicamente inevitável de produtos convencionais por produtos transgénicos, atribuída a uma maior vulgarização no uso de OGM. Estes resultados foram verificados por PCR em tempo real com utilização de sondas de hidrólise do tipo TaqMan, que permitiu também verificar uma elevada proporção de material GM ao longo do processo industrial (50%) e que as sementes mais recentes, supostamente convencionais, continham cerca de 10% de OGM.

O aspecto mais inovador deste trabalho consistiu nos avanços relativos à detecção de ADN em óleos refinados. Para tal, a optimização e comparação de 4 metodologias de extracção de ADN foi fundamental, permitindo concluir que dos métodos testados, o mais adequado foi através da utilização do kit Nucleospin® food kit. Através do uso deste método foi possível a obtenção de ADN amplificável por PCR qualitativa, a partir de todas as etapas de refinação do óleo de soja e de todas as amostras de óleos comerciais. A análise por PCR em tempo real permitiu confirmar os resultados obtidos para cada fase da refinação do óleo de soja e permitiu obter uma estimativa da quantidade de ADN de soja presente em quase todas as amostras de óleos comerciais. Estes dados vêm assim comprovar a presença de fragmentos de ADN amplificáveis nos óleos vegetais refinados, constituindo um avanço considerável em relação aos trabalhos descritos na literatura, que referem sobretudo a possibilidade



de detectar a ADN em óleos crus e azeites não refinados. Estes resultados poderão contribuir para um avanço na detecção de ADN GM em óleos vegetais, permitindo rastrear possíveis adulterações quanto ao tipo de sementes utilizadas na sua produção e verificar a rotulagem em conformidade com a legislação da UE.



---

# **BIBLIOGRAFIA**



# BIBLIOGRAFIA

---

- Ahmed, F. E.; 2002. Detection of genetically modified organisms in foods; *Trends Biotechnol*; **20**; 215-223.
- Akoh, C. C.; Min, D. B.; 2002. Food lipids; Akoh, C. C.; Min, D. B. (eds) *Marcel Dekker Inc*; New York-Basel.
- Amaral, J.; 2005. Contribuição para a caracterização química das folhas e sementes de avelã (*Corylus Avellana* L.) e de nozeira (*Juglans Regia* L.), Dissertação de candidatura ao grau de Doutor, apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.
- Anklam, E.; Gadani, F.; Heinze, P.; Pijnenburg, H.; van Den Eede, G.; 2002. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products; *Eur Food Res Technol*; **214**; 3-26.
- Anderson, J. A.; 1996. Allergic reactions to foods; *Crit Rev Food Sci Nutr*; **36**; S19-38.
- Astwood, J. D.; Leach, J. N.; Fuchs, R. L.; 1996. Stability of food allergens to digestion in vitro; *Nat. Biotechnol.*; **14**; 1269-1273.
- Barber, D.; Rodríguez, R.; Salcedo, G.; 2008. Molecular profiles: A new tool to substantiate serum banks for evaluation of potential allergenicity of GMO; *Food and Chemical Toxicology*; **46**; S35-S40.
- Batista, R.; Nunes, B.; Carmo, M.; Cardoso, C.; Jose, H. S.; de Almeida, A. B.; Manique, A.; Bento, L.; Ricardo, C. P.; Oliveira, M. M.; 2005. Lack of detectable allergenicity of transgenic maize and soya samples; *Journal of Allergy and Clinical Immunology*; **116**; (2); 403-410.
- Besler, M.; Helm, K. M.; Ogawa, T.; 2000. Allergen data collection-update: soybean (*Glycine max*). *Internet Symposium food allergens 2000*; **2** (3); 1-35.
- Biotech; Informação científica sobre biotecnologia; ano 1; nº1; 2003
- Birt, D. F.; Hendrick, S.; Alekel, D. L.; 2004. Soybean and the prevention of chronic human disease. In *Soybeans: Improvement, Production, and Uses*; 3rd ed.; Boerma, H. R.,

Specht, J. E. (Eds.); Agronomy Monographs; **16**; ASA-CSSA-SSSA; Madison; WI; 1047-1117.

Bock, S. A.; 1987. Prospective appraisal of complaints of adverse reactions to foods in children during the first three years of life; *Paediatrics*; **79**; 683-688.

Bogani, P.; Minunni, M.; Spiriti, M. M.; Zavaglia, M.; Tombelli, S.; Buiatti, M.; Mascini, M.; 2009. Transgenes monitoring in an industrial soybean processing chain by DNA-based conventional approaches and biosensors; *Food Chemistry*; **113**; 658-664.

Busconi, M.; Foroni, C.; Corradi, M.; Bongiorni, C.; Cattapan, F.; Fogher, C.; 2003. DNA extraction from olive oil and its use in the identification of the production cultivar; *Food Chemistry*; **83**; 127-134.

Cahoon, E. B.; 2003. Genetic enhancement of soybean oil for industrial uses: prospects and challenges; *AgBioForum*; **6** (1-2); 11-13.

Cellini, F.; Chesson, A.; Colquhoun, I.; Constable, A.; Davies, H. V.; Engel, K. H. ; Gatehouse, A. M. R. ; Kärenlampi, S.; Kok, E. J.; Leguay, J. J.; Lehesranta, S.; Noteborn, H. P. J. M.; Pedersen, J.; Smith, M.; 2004. Unintended effects and their detection in genetically modified crops; *Food and Chemical Toxicology*; **42**; 1089-1125.

Clive, M.; 2005. Allergenic potential of novel foods; *Proceedings of the Nutrition Society*; **64**; 487-490.

Conceição, F. R.; Moreira, A. N.; Binsfeld, P. C.; 2006. Detecção de organismos geneticamente modificados em alimentos e ingredientes alimentares; *Ciência Rural*; Santa Maria; **36** (1); 315-324.

Conner, A. J.; Glare, T. R.; Nap, J. P.; 2003. The release of genetically modified crops into the environment; Part II - Overview of ecological risk assessment; *Plant J*; **33**; 19-46.

Consolandi, C.; Palmieri, L.; Severgnini, M.; Maestri, E.; Marmioli, N.; Agrimonti, C.; Baldoni, L.; Donini, P.; De Bellis, G.; Castiglioni, G., 2008. A procedure for olive oil traceability and authenticity: DNA extraction, multiplex PCR and LDR-universal array analysis; *Eur. Food Res. Technol.*; **227**; 1429-1438.

Cordle, C. T.; 2004. Soy protein allergy: incidence and relative severity; *J. Nutr.*; **134**; 1213 S–9.

- Decreto-Lei 106/2005 de 29 de Junho de 2005, relativo ao estabelecimento das características das gorduras e óleos vegetais destinados à alimentação humana, as condições a observar na sua obtenção ou tratamento, bem como as regras da sua comercialização, e o respectivo regime sancionatório, procedendo à revogação da Portaria nº928/98, de 23 de Outubro. *Diário da República*, **123**; 4034-4042.
- Dijkstra, A. J.; 1993. Degumming, refining, washing and drying of fats and oils, in Processing of the World Conference on Oilseed Technology and Utilization, Applewhite, T.H. (Ed.), AOCS Press, Champaign, IL; 138–151.
- Directiva 2001/18/CE de 12 de Março de 2001, relativa à libertação deliberada no ambiente de organismos geneticamente modificados e que revoga a Directiva 90/220/CEE. *J Ofi Com Eur*, 17-4-2001; L 106; 1-38.
- Dowd, M. K.; 1998. Gas Chromatographic Characterization of Soapstocks from Vegetable Oil Refining, *J. Chromatogr. A*; **816**; 185–193.
- Doyle, J. J.; Doyle, J. L.; 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue; *Focus*; **12**; 13-15.
- Doveri, S.; Lee, D.; 2007. Development of sensitive crop-specific Polymerase Chain Reaction assays using 5S DNA: Applications in Food Traceability; *J. Agric. Food Chem.*; **55**; 4640-4644.
- Elenis, D. S.; Kalogianni, D. P.; Glynou, K.; Ioannou, P. C.; Christopoulos, T. K.; 2008. Advances in molecular techniques for the detection and quantification of genetically modified organisms; *Anal Bioanal Chem*; **392**; 347-354.
- FAO/WHO; 2000. Report of a joint FAO/WHO Expert consultation on foods derived from biotechnology; *Food and Agriculture Organisation of the United Nations*; Geneva, 29 May – 2 June 2000; Rome; disponível em <http://www.fao.org/es/esnbiotech.htm>
- Ferrari, R. A.; Esteves, W.; Mukherjee, K. D.; Schulte, E.; 1997. Alterations of sterols and steryl esters in vegetables oils during industrial processing; *J. Agric. Food Chem.*; **45**; 4753-4757.
- Ferrari, R. A.; Schulte, E.; Esteves, W.; Bruhl, L.; Mukherjee, K. D.; 1996. Minor constituents of vegetables oils during industrial processing; *J. Am. Oil Chem. Soc.*; **73**; 587-592.

- Firestone, D.; Reina, R. J.; 1996. Authenticity of vegetable oils. In *Food authentication*; Ashurst, P. R.; Dennis, M. J. (Eds.), Chapman & Hall: London.
- García-Cañas, V.; González, R.; Cifuentes, A.; 2004. Sensitive and simultaneous analysis of five transgenic maizes using multiplex polymerase chain reaction, capillary gel electrophoresis, and laser-induced fluorescence; *Electrophoresis*; **25**; 2219-2226.
- Gizzarelli, F.; Corinti, S.; Barletta, B.; Lacovacci, P.; Brunetto, B.; Butteroni, C.; Afferni, C.; Onoriw, R.; Miraglia, M.; Panziniz, G.; Di Felice, G.; Tinghino, R.; 2006. Evaluation of allergenicity of genetically modified soybean protein extract in a murine model of oral allergen-specific sensitization; *Clinical and Experimental Allergy*; **36**; 238-248.
- Glynou, K.; Ioannou, P. C.; Christopoulos, T. K.; 2004. Detection of transgenes in soybean via a polymerase chain reaction and a simple bioluminometric assay based on a universal aequorin-labeled oligonucleotide probe; *Anal. Bioanal. Chem.*; **378** (7); 1748-1753.
- Gryson, N.; Ronsse, F.; Messens, K.; De Loose, M.; Verleyen, T.; Dewettinck, K.; 2002. Detection of DNA during the refining of soybean oil; *JAOCS*; **79** (2); 171-174.
- Gryson, N.; Messens, K.; Dewettinck, K.; 2004. Influence of different oil-refining parameters and sampling size on the detection of genetically modified DNA in soybean oil; *JAOCS*; **81** (3); 231-234.
- Gryson, N.; Messens, K.; Dewettinck, K.; 2008. PCR detection of soy ingredients in bread; *Eur Food Res Technol*; **227** (2); 345-351.
- Harrigan, G. G.; Ridley, W. P.; Riordan, S. G.; Nemeth, M. A.; Sorbet, R.; Trujillo, W. A.; Breeze, M. L.; Schneider, R. W.; 2007. Chemical composition of Glyphosate-Tolerant Soybean 40-3-2 grown in Europe remains equivalent with that of Conventional Soybean (*Glycine max* L.); *J. Agric. Food Chem.*; **55**; 6160-6168.
- Hellebrand, M.; Nagy, M.; Mörsel, J. T.; 1998. Determination of DNA traces in rapeseed oil; *Z Lebensm Unters Forsch A*; **206**; 237-242.
- Helm, R. M.; Burks, A. W.; 2000. Mechanisms of food allergy; *Curr Opin Immunol*; **12**; 647-653.
- Hernández, M.; Rodríguez-Lázaro, D.; Zhang, D.; Esteve, T.; Pla, M.; Prat, S.; 2005. Interlaboratory transfer of a PCR multiplex method for simultaneous detection of four genetically modified maize lines: Bt11, MON810, T25 and GA21; *J Agric Food Chem*; **53** (9); 3333-3337.



- Holst Jensen, A.; Rønning, S. B.; Løvseth, A.; Berdal, K. G.; 2003. PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs); *Analytical and Bioanalytical Chemistry*; **375**; 985-993.
- ISO 5509 de 2000 – Animal and vegetable fats and oils – Preparation of methyl esters of fatty acids; Second Edition 01-04-2000.
- ISO 21570 (2005) Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Quantitative nucleic acid based methods; 1st ed. *International Standard ISO 21570*; ISO; Geneva.
- Kalogianni, D. P.; Koraki, T.; Christopoulos, T. K.; Ioannou, P. C.; 2006. Nanoparticle-based DNA biosensor for visual detection of genetically modified organisms; *Biosensors and Bioelectronics*; **21** (7); 1069-1076.
- Khakoo, A.; Lack, G.; 2004. Preventing food allergy; *Curr Allergy Asthma Rep*; **4**; 36-42.
- König, A.; Cockburn, A.; Crevel, R. W. R.; Debruyne, E.; Grafstroem, R.; Hammerling, U.; Kimber, I.; Kuiper, H. A.; Peijnenburg, A. A. C. M. P.; Pinninks, A. H.; Poulsen, M.; Schauzu, M.; Wal, J. M.; 2004. Assessment of the safety of foods derived from genetically modified (GM) crops; *Food Chem Toxicol*; **42**; 1047-1088.
- Kuiper, H. A.; Kleter, G. A.; Noteboom, H. P. J. M.; Kok, E. J.; 2002. Substantial equivalence – an appropriate paradigm for the safety assessment of modified foods?; *Toxicology*; **181-182**; 427-431.
- James, C.; 2008. Situação global das culturas biotecnológicas/GM comercializadas; Brief 39; International Service for Acquisition of Agro-Biotech Application (ISAAA); disponível em <http://www.isaaa.org>.
- Jung, M. Y.; Yoon, S. H.; Min D. B.; 1989. Effects of processing steps on the contents of minor compounds and oxidation of soybean oil; *JAOCS*; **66** (1); 118-120.
- Ladics, G. S.; Selgrade, M. K.; 2008. Identifying Food Proteins with Allergenic Potential: Evolution of Approaches to Safety Assessment and Research to Provide Additional Tools; *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, in press (doi: 10.1016/j.yrtph.2008.10.010).
- La Paz, J. L.; García-Muniz, N.; Nadal, A.; Esteve, T.; Puigdomènech, P.; Pla, M.; 2006. Interlaboratory transfer of a real-time polymerase chain reaction assay for quantitative detection of genetically modified maize event TC-1507; *JAOAC*; **89** (5) 1347-1352.

- Lee, G. J.; Wu, X.; Shannon, J. G.; Sleper, D. A.; Nguyen, H. T.; 2007. Soybean: in Genome mapping and molecular breeding in plants, Volume 2; Oilseeds; Kole, C. (Ed.); Springer-Verlag; Berlin Heidenberg.
- Leimanis, S.; Hernández, M.; Fernández, S.; Boyer, F.; Burns, M.; Bruderer, S.; Glouden, T.; Harris, N.; Kaeppli, O.; Philipp, P.; Pla, M.; Puigdomènech, P.; Vaitilingom, M.; Bertheau, Y.; Remacle, J.; 2006. A Microarray-based Detection System for Genetically Modified (GM) Food Ingredients; *Plant Mol. Biol.*; **61** (1-2); 123-139.
- Lipp, M.; Brodmann, P.; Pietsch, K.; Pauwels, J.; Anklam, E.; 1999. IUPAC collaborative trial study to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder; *Journal of the AOAC International*; **82**; 923-928.
- Liu, K.; 1997. Soybeans: Chemistry, Technology and Utilization. *Aspen Publishers*, Gaithersburg, MD; 532.
- Mafra, I. et al; Quantificação de soja geneticamente modificada em alimentos (dados não publicados).
- Mafra I., Oliveira M. B. P. P.; 2004. Organismos geneticamente modificados e alimentos derivados: I. Legislação; Riscos Ambientais e Segurança Alimentar, *Alimentação Humana*; **10** (3); 131-145.
- Mafra, I.; Oliveira, M. B. P. P.; 2005. Organismos geneticamente modificados e alimentos derivados: II. Métodos de detecção e quantificação; *Alimentação Humana*; **11** (2); 71-89.
- Mafra, I.; Silva, S. A.; Moreira, E. J. M. O.; Silva, C. S. F.; Oliveira, M. B. P. P., 2008a. Comparative study of DNA extraction methods for soybean derived food products, *Food Control*; **19**; 1183–1190.
- Mafra, I.; Ferreira, I. M. P. L. V.; Oliveira, M. B. P. P., 2008b. Food authentication by PCR-based methods, *Eur Food Res Technol*; **227**; 649–665.
- Matsuda, T; Nakamura, R; 1993. Molecular structure and immunological properties of food allergens; *Trends Food Sci Technol*; **4**; 289-293.
- McKeon, T. A.; 2003. Genetically modified crops for industrial products and processes and their effects on human health; *Trends in Food Science & Technology*; **14**; 229-241.

Método oficial 923.03; Ash of Flour (32.1.05); Cereal Foods, Official methods of Analysis 2000; 17<sup>th</sup> ed; AOAC; **32**; 2.

Método oficial 945.39; Soybean Flour (32.2.09); Cereal Foods, Official methods of Analysis 2000; 17<sup>th</sup> ed; AOAC; **32**; 43.

Método oficial 925.10; Solids (Total) and Moisture in Flour; Cereal Foods, Official methods of Analysis 2000; 17<sup>th</sup> ed; AOAC; **32**; 1.

Meyer, R.; Jaccaud, E.; 1997. Detection of genetically modified soya in processed food products: development and validation of a PCR assay for the specific detection of glyphosate-tolerant soybean. In Proceedings of Euro Food Chem IX; Amadò, R.; Battablia, R. (Eds.) Swiss Society of Food and Environmental Chemistry; Interlaken, Switzerland; 23-28.

Miraglia, M.; Berdal, K. G.; Brera, C.; Rentsch, J.; van Rie, J. P. P. F.; Zagon, J.; 2004. Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain; *Food Chem Toxicol*; **42**; 1157-1180.

Nadal, A.; Coll, A.; La Paz, J. L.; Esteve, T.; Pla, M.; 2006. A new PCR–CGE (size and color) method for simultaneous detection of genetically modified maize events; *Electrophoresis*; **27**; 3879-3888.

Nordlee, J. A.; Taylor, S. L.; Townsend, J. A.; Thomas, L. A.; Bush, R. K.; 1996. Identification of a Brazil-nut allergen in transgenic soybeans; *N Engl J Med*; **334**; 688-692.

NP EN ISO 659 (1998) – Sementes oleaginosas – Determinação do teor de óleo em sementes; termo de homologação nº25/2002, de 24-01-2002; Instituto Português da Qualidade.

NP EN ISO 660 (1999) – Óleos e gorduras animais e vegetais – Determinação do índice de acidez e da acidez; termo de homologação nº323/2002, de 04-12-2002; Instituto Português da Qualidade.

NP 1539 (2004) – Gorduras e óleos alimentares comestíveis. Óleo de soja – Definição, características e acondicionamento.

NP EN ISO 12228 (1999) – Óleos e gorduras de origem animal e vegetal – Determinação dos teores totais e individuais de esteróis. Método por cromatografia gasosa; termo de homologação nº92/2001, de 29-03-2001; Instituto Português da Qualidade.

- Obeid, P. J.; Christopoulos, T. K.; Ioannou, P. C.; 2004. Rapid analysis of genetically modified organisms by in-house developed capillary electrophoresis chip and laser-induced fluorescence system; *Electrophoresis*; **25**; 922-930.
- O'Brien, R.D., 2000. Fats and oils: an overview. In *Introduction to Fats and Oils Technology*, 2nd ed.; O'Brien, R.D.; Farr, W.E.; Wan, P.J. (Eds.); AOCS Press; Champaign; IL; 1-6.
- O'Brien, R.D., 2004. Fats and oils: *Formulating and Processing for Applications*; 2nd ed.; O'Brien, R.D. (Eds.); CRC Press, LLC, Boca Raton, London, New York. Washington D.C.
- Oomen, C. M.; Ocke, M. C.; Feskens, E. J. M.; van Erp-Baart, M. A. J.; Kok, F. J.; Kromhout, D.; 2001. Association between trans fatty acid intake and 10-year risk of coronary heart disease in the Zutphen Elderly Study: a prospective population-based study; *The Lancet*; **357**; 746-751.
- Ortega-García, J.; Gámez-Meza, N.; Noriega-Rodriguez, J. A.; Dennis-Quiñonez, O.; García-Galindo, H. S.; Angulo-Guerrero J. O.; Medina-Juárez, L. A.; 2006. Refining of high oleic safflower oil: Effect on the sterols and tocopherols content; *Eur Food Res Technol*; **223**; 775-779.
- Padgett, S. R.; Taylor, N. B.; Nida, D. L.; Bailey, M. R.; MacDonald, J.; Holden, L. R.; Fuchs, R. L.; 1996. The Composition of Glyphosate-Tolerant Soybean Seeds Is Equivalent to that of Conventional Soybean; *Journal of Nutrition*; **126** (3); 702-716.
- Pafundo, S.; Agrimonti, C.; Marmioli, N.; 2005. Traceability of plant contribution in olive oil by amplified fragment length polymorphisms; *J. Agric. Food Chem.*; **53**; 6995-7002.
- Pasqualone, A.; Montemurro, C.; Summo, C.; Sabetta, W.; Caponio, F.; Blanco, A.; 2007. Effectiveness of microsatellite DNA markers in checking the identity of Protected Designation of Origin extra virgin olive oil; *J. Agric. Food Chem.*; **55**; 3857-3862.
- Pauli, U.; Liniger, M.; Zimmermann, A.; 1998. Detection of DNA in soybean oil; *Z Lebensm Unters Forsch A*; **207**; 264-267.
- Prescott, V. E.; Hogan, S. P.; 2006. Genetically modified plants and food hypersensitivity diseases: Usage and implications of experimental models for risk assessment; *Pharmacology & Therapeutics*; **111**; 374 – 383.
- Poms, R. E.; Klein, C. L.; Anklam, E.; 2004. Methods for allergen analysis in food: A review; *Food Additives and Contaminants*; **21**; 1–31.

- Querci, M.; Maretti, M.; Mazzara, M.; 2006. Qualitative detection of MON 810 Maize, Bt-176 Maize and Roundup Ready<sup>®</sup> Soybean by PCR (Session 9). In *Training course on The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms*; Querci, M.; Jermini M.; Eede G.V. (Eds.); European Commission DG-JRC; disponível em <http://gmotraining.jrc.it>
- Quílez, J.; Garcia-Lorda, P.; Salas-Salvado, J.; 2003. Potential uses and benefits of phytosterols in diet: present situation and future directions; *Clinical Nutrition*; **22** (4); 343-351.
- Regulamento (CE) 258/97 de 27 de Janeiro de 1997 relativo a novos alimentos e ingredientes alimentares. *J Ofi Com Eur*, 14-02-1997, L 043, 0001-0006.
- Regulamento (CE) 1829/2003 de 22 de Setembro de 2003, relativo a géneros alimentícios e alimentos para animais geneticamente modificados. *J Ofi Uni Eur*, 18-10-2003, L 268, 1-23.
- Regulamento (CE) 1830/2003 de 22 de Setembro de 2003, relativo à rastreabilidade e rotulagem de organismos geneticamente modificados e à rastreabilidade dos géneros alimentícios e alimentos para animais a partir de organismos geneticamente modificados e que altera a Directiva 2001/18/CE. *J Ofi Uni Eur*, 18-10-2003, L 268, 24-28.
- Rott, M. E.; Lawrence, T. S.; Wall, E. M.; Green, M. J.; 2004. Detection and quantification of Roundup Ready Soy in foods by conventional and real-time Polymerase Chain Reaction; *J. Agric. Food Chem.*; **52**; 5223-5232.
- Sampson, H. A.; 1997. Food allergy; *JAMA*; **278**; 1888-1894.
- Sayago, A.; Marín, M. I.; Morales, M. T.; 2007. Vitamina E y aceites vegetales; *Grasas y Aceites*, **58** (1); 74-86.
- Sciancalepore, V.; 1981. The Influence of Processing on the Content and Composition of Free and Esterified Sterols in Sunflower Seed Oil; *Oli Grassi Deriv*, **17**; 11–12.
- Sicherer, S.H.; 2000. Determinants of systemic manifestations of food allergy; *J. Allergy Clin. Immunol.*; **106**, 251-257.
- Singh, C. K.; Ojha, A.; Bhatanagar, R. K.; Kachru, D. N.; 2008. Detection and characterization of recombinant DNA expressing vip3A type insecticidal gene in GMOs – standard single, multiplex and construct specific PCR assays; *Anal. Bioanal. Chem.*; **390**; 377-387.

- Somma M.; Querci, M.; 2006. The Polymerase Chain Reaction (PCR) (Session 6). In *Training course on The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms*; Querci, M.; Jermini, M.; Eede, G.V. (Eds.); European Commission DG-JRC; disponível em <http://gmotraining.jrc.it>
- Stave, J. W.; 1999. Detection of new or modified proteins in novel foods derived from GMO – future needs; *Food Control*, **10**; 367-374.
- Stave, J. W.; 2002. Protein immunoassay methods for detection of biotech crops: applications, limitations, and practical considerations. *JAOAC Int*, **85**; 780-786.
- Tasan, M.; Demirci, M.; 2003. Trans FA in sunflower oil at different steps of refining; *JAOCs*; **80** (8); 825-828.
- Tasan, M.; Demirci, M.; 2005. Total and individual tocopherol contents of sunflower oil at different steps of refining; *Eur Food Res Technol*, **220**; 251-254.
- Van Hoed, V.; Depaemelaere, G.; Ayala, J. V.; Santiwattana, P.; Verhe, R.; De Greyt, W.; 2006. Influence of chemical refining on the major and minor components of rice bran oil; *JAOCs*; **83** (4); 315-321.
- Verleyen, T.; Sosinka, U.; Ioannidou, S.; Verhe, R.; Dewettinck, K.; Huyghebaert, A.; Greyt, W.; 2002. Influence of the vegetable oil refining process on free and esterified sterols; *J. Am. Oil Chem. Soc.*; **79**; 947-953.
- Vollenhofer, S.; Burg, K.; Schmidt, J.; Kroath, H.; 1999. Genetically modified organisms in food - screening and specific detection by polymerase chain reaction; *J Agric Food Chem*; **47**; 5038-5043.
- Xu, J.; Miao, H.; Wu, H.; Huang, W.; Tang, R.; Qiu, M.; Wen, J.; Zhu, S.; Li, Y.; 2006. Screening genetically modified organisms using multiplex-PCR coupled with oligonucleotide microarray; *Biosens. Bioelectron.*; **22** (1); 71-77.
- Wakins, C.; 2002. Cholesterol: the molecular Dr. Jekyll and Mr. Hyde, *INFORM*, **13**, 886-888.
- Weidemann, L. H.; 1981. Degumming, refining and bleaching soybean oil; *JAOCs*; **58**; 159-165.

Weighardt, F.; 2006. Quantitative PCR for detection of GMOs (Session 10). In *Training course on The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms*; Querci, M.; Jermini, M.; Eede, G.V. (Eds.); European Commission DG-JRC; disponível em <http://gmotraining.jrc.it>

Wilson, R. F.; 2004. Seed composition. In *Soybeans: Improvement, Production, and Uses*; 3rd ed.; Boerma, H. R.; Specht, J. E. (Eds.); Agron Monogr; **16**; ASA-CSSA-SSSA; Madison; WI; 621-677.

Wrenn, L. B.; 1995. Pioneer oil chemists: Allbright, Wesson, *INFORM*, **6**, 98-99.

Wurz, A.; Bluth, A.; Zeltz, P.; Pfeifer, C.; Willmund, R.; 1999. Quantitative analysis of genetically modified organisms (GMO) in processed food by PCR-based methods. *Food Control*; **10**; 385-389.

**Webgrafia** – [http://www.soystats.com/2008/page\\_35.htm](http://www.soystats.com/2008/page_35.htm) - acedido em 14 de Janeiro de 2009.